N° D'ORDRE :
17

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

Y. CHARPENTIÉ

1re THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES FACTEURS DE L'ACIDITÉ DES VINS

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le , *devant la Commission d'Examen :*

MM. GENEVOIS *Président.*
ALLARD } *Examinateurs.*
RIBEREAU-GAYON }

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, Rue Keppler, Paris-16e

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543913_0029

N° D'ORDRE :
617

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE BORDEAUX

POUR OBTENIR

LE TITRE D'INGÉNIEUR-DOCTEUR

PAR

Y. CHARPENTIÉ

1re THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES FACTEURS DE L'ACIDITÉ DES VINS

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté.

Soutenues le , *devant la Commission d'Examen :*

MM. GENEVOIS *Président.*
ALLARD
RIBEREAU-GAYON } *Examinateurs.*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
7, Rue Keppler, Paris-16e

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DES SCIENCES

	MM.	
Doyen	BRUS	
Doyens honoraires	PADE	Recteur honoraire de l'Acad. d'Aix
	PICART	Membre de l'Institut
	DUPONT	Directeur de l'École Normale Sup.
	CHAINE	
	MERCIER	
Professeurs honoraires	PADE	Recteur honoraire de l'Acad. d'Aix
	BOUNHIOL	
	DEVAUX	Membre de l'Institut
	DUPONT	Diretceur de l'École Normale Sup.
	PICART	Membre de l'Institut
	DAURE	Recteur de l'Académie de Caen
	CHAINE	
	KASTLER	Professeur à la Sorbonne
	QUELET	Professeur à la Sorbonne
Professeurs	MERCIER	Radioélectricité
	MILLOUX	Calcul infinitésimal
	DANGEARD	Botanique
	GENEVOIS	Chimie biologique et Physiologie végétale
	CAU	Physique expérimentale
	BRUS	Chimie
	AVEL	Zoologie et Physiologie animale
	ROUSSET	Physique générale
	ROGER	Mécanique rationnelle
	WEILL	Anatomie comparée et Embryogénie
	SERVANT	Physique
	DUFRESNOY	Mathématiques générales
	LAFON	Physiologie générale
	DAVID	Biologie végétale
	PISOT	Calcul des probabilités
	BOUNHIOL	Biologie animale
	SCHOELLER	Géologie
	GAY	Minéralogie
	CALAS	Chimie organique
	GUIZONNIER	Physique
	ALLARD	Chimie
	LAMARE	Géologie
	PATY	Chimie
	COLMEZ	Mathématiques
	PACAULT	Chimie physique
	Mlle JOSIEN	Chimie minérale
	RIBEREAU-GAYON	Œnologie et chimie agricole
	CAMBAR	Biologie générale
Maîtres de conférences honoraire	de PUYMALY	
Maître de conférences	MALVESIN-FABRE.	Botanique
	VIGNEAUX	Géologie
Secrétaire principal	ARTIGUELONG	

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

A LA MÉMOIRE DE MON PÈRE

A MA FEMME ET A MES ENFANTS

Les amicales discussions que nous avons eues avec M. E. PEYNAUD, Ingénieur-Docteur chargé de recherches à la Station Œnologique, ses conseils et ses directives ont été pour nous une aide précieuse et efficace.

Nous lui exprimons, avec nos remerciements, notre reconnaissance la plus vive.

M. le Professeur J. RIBEREAU-GAYON

Directeur de la Station Œnologique de Bordeaux

a inspiré et guidé ce travail.

Son amabilité, ses conseils, son enseignement ont été pour nous de précieux encouragements.

Qu'il veuille bien trouver ici le modeste témoignage de notre profonde et respectueuse gratitude.

M. le Professeur L. GENEVOIS

Professeur de Chimie Biologique

a permis que ce travail se poursuive dans son laboratoire et nous a fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse.

Nous tenons à lui exprimer notre sincère reconnaissance et nos sentiments de profonde admiration.

PREMIÈRE THÈSE

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES FACTEURS DE L'ACIDITÉ DES VINS

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE BIOCHIMIQUE DES FACTEURS DE L'ACIDITÉ DES VINS

PAR

Y. CHARPENTIÉ

Ingénieur-Docteur

INTRODUCTION

Il est reconnu que le goût d'un vin peut être considéré schématiquement comme le résultat d'un équilibre entre, d'un côté, des sensations douces et sucrées, et d'un autre côté, des sensations acides et amères. Les premières sont dues à l'alcool, au glycérol et naturellement aux sucres qui peuvent exister dans les vins ; les secondes sont dues aux acides et aux polyphénols.

Un équilibre harmonieux entre ces saveurs élémentaires, joint aux éléments particuliers du bouquet, conditionne la qualité d'un vin. Pour qu'un vin soit reconnu de qualité, il ne suffit donc pas qu'il contienne tel ou tel constituant à telle ou telle dose. Il faut en particulier que les goûts acides et astringents soient exactement équilibrés, neutralisés, pourrait-on dire, par l'impression sucrée que donnent d'autres éléments.

Les acides organiques sont certainement les substances qui influent le plus sur le goût du vin, beaucoup plus, semble-t-il que les autres constituants. Une insuffisance d'acidité rend la conservation difficile, mais un excès d'acidité est toujours préjudiciable à la qualité. L'expérience gustative montre que les grands vins bien réussis sont toujours des vins d'acidité faible. Ceci est vrai aussi bien du reste, pour les vins blancs que pour les vins rouges, pour lesquels ces principes sont bien connus. Les travaux de Genevois, Ribéreau-Gayon et Peynaud ont mis en lumière ce rôle important des acides.

Les acides du vin ont déjà donné lieu à un grand nombre d'études analytiques. La plupart de ces travaux sont des études statiques. Elles considèrent la composition, les caractères d'un vin, ses particularités à un moment donné de son évolution. L'application expérimentale à l'oenologie des connaissances sur le métabolisme des acides organiques est encore incomplète. Les observations anciennes sont souvent peu utilisables parce que leurs auteurs manquaient de moyens d'investigation précis et sûrs, et principalement de méthodes analytiques. La seule étude d'ensemble suffisamment détaillée est celle de Peynaud (1), qui, après

avoir donné des techniques de dosage, suivit l'évolution des acides au cours de la maturation du raisin, de la fermentation alcoolique et de la fermentation malolactique. Mais l'auteur lui-même n'envisageait son travail que comme une introduction à l'étude de ces problèmes.

D'après ces travaux, les phénomènes d'ordre biochimique qui commandent la composition acidimétrique d'un vin, sont dans l'ordre chronologique : la maturation du raisin, la fermentation alcoolique, la fermentation malolactique et les fermentations lactiques de maladie.

La maturation du raisin s'effectue sous l'influence de divers facteurs, variables chaque année, et qui chaque année en modifient l'évolution. Ce sont entre autres : les conditions climatiques, le sol, le cépage, l'exposition du vignoble, facteurs qui commandent l'équilibre entre la migration et la combustion respiratoire, dont dépend le stockage des réserves dans le fruit. L'étude de la maturation des raisins a déjà fait l'objet de nombreuses publications qui ont développé et confirmé les travaux anciens de Girard et Lindet (2). Peynaud a entrepris au cours de deux années consécutives une étude systématique de la maturation dans laquelle il a montré, notamment, le rôle des facteurs énoncés précédemment et la présence dans les moûts étudiés des seuls acides malique, citrique et tartrique ; du moins les autres acides organiques présents n'ont pas une concentration supérieure au milliéquivalent par litre. Cet auteur a mis en évidence l'importance pour la qualité du vin, du taux d'acide malique du raisin.

La formation des produits secondaires de la fermentation alcoolique, en particulier des acides, a été étudiée d'une manière très approfondie, depuis Pasteur, par de nombreux chercheurs. Les hypothèses de Génevois à ce sujet (3) ont été confirmées par un très grand nombre de documents analytiques (4).

Les transformations du vin par les bactéries ont donné lieu à d'importantes études, tant en ce qui concerne la fermentation malolactique que les fermentations de maladie. L'importance de la fermentation malolactique a été bien établie en France par les travaux de Ferré (5) et de Ribéreau-Gayon (6).

La contribution à l'étude des acides que nous apportons dans notre travail, se limite à deux phénomènes qui jouent pour la vinification des vins blancs le même rôle essentiel, puisqu'ils aboutissent finalement à une diminution de l'acidité du vin. Ce sont l'action du *Botrytis cinerea*, agent de la pourriture noble, sur les acides des raisins et l'action des bactéries malolactiques sur les acides des vins.

La plus grande partie des vins blancs récoltés en Gironde provient de raisins plus ou moins pourris. L'usage de ne commencer les vendanges que lorsque les raisins sont suffisamment attaqués par le *Botrytis cinerea* s'est de plus en plus généralisé. Or, si l'on connaît assez bien l'évolution

de la composition d'un raisin sain au cours de sa maturation, encore qu'on ne puisse pas la prévoir en fonction des conditions atmosphériques de l'année, on connaît beaucoup plus mal l'influence du *Botrytis cinerea* sur les différents constituants du raisin.

Les études sur ce sujet sont anciennes, et cependant on ne peut nier l'intérêt d'une connaissance plus précise des phénomènes qui sont le fondement de la composition des grands vins blancs. C'est dans ce but qu'il nous a paru utile d'entreprendre l'étude de ces phénomènes, en ayant principalement en vue les transformations acidimétriques qu'ils provoquent. Le chapitre II de notre travail groupe les essais sur la physiologie du *Botrytis cinerea*, effectués au laboratoire et au vignoble.

Nous consacrons le chapitre III à l'étude de la fermentation malolactique appliquée plus spécialement aux vins blancs. Nos connaissances à ce sujet concernaient surtout les vins rouges. Nous exposons les résultats de notre expérimentation s'appliquant à l'étude des mécanismes ou visant à atteindre un but pratique. Nous essayons de préciser les relations de cette transformation avec différents facteurs et notamment avec les conditions de la vinification. Nous recherchons d'autre part à nous rendre compte de son utilité pratique dans le cas des vins blancs secs.

Pour mener à bien ces études, il a été nécessaire de mettre au point des méthodes de dosage appropriées. La grande richesse en sucre des moûts de raisin et des vins liquoreux rend souvent difficiles certaines déterminations. C'est ainsi que les dosages de l'acide lactique et du glycérol ont dû subir des adaptations qui d'ailleurs rendent ces méthodes plus correctement applicables à tous les milieux. De même nous avons dû instituer une méthode de dosage de l'acide gluconique, pouvant s'appliquer également à des milieux très sucrés. Ces études analytiques sont rassemblées dans le premier chapitre.

CHAPITRE PREMIER

MÉTHODES ANALYTIQUES UTILISÉES

Nous donnerons un exposé rapide des bilans acidimétriques, ainsi que du principe des différentes méthodes d'analyses qui ont permis la préparation de ce travail. Nous insistons particulièrement sur trois méthodes de dosage auxquelles nous avons apporté une contribution personnelle importante : dosages des acides lactique et gluconique et dosage du glycérol.

Dans l'analyse détaillée des acides d'un milieu, l'établissement du bilan acidimétrique fournit la preuve que tout a été correctement dosé. Dans le cas où le bilan n'est pas équilibré, il renseigne sur la proportion d'acides indosés. Comme l'indiquent Ribéreau-Gayon et Peynaud (7) on peut dresser différentes sortes de bilans des acides.

Bilan acidimétrique. — Les milieux que nous étudierons, moûts de raisins et vins, ont une acidité correspondant comme ordre de grandeur à celle d'une solution décinormale ; leur pH est compris entre pH 3,0 et 4,0. Ces milieux sont constitués, au point de vue acidimétrique, par des acides organiques, partiellement neutralisés par des bases ; une partie de ces acides est à l'état de sels, l'autre est à l'état libre. La fraction libre est déterminée en neutralisant le vin avec de la soude titrée jusqu'à la neutralité théorique (pH 7,07) ; elle correspond à l'acidité de titration. La fraction salifiée est représentée en première approximation par l'alcalinité des cendres, majorée de la petite quantité de cation ammonium présente. On trouvera les détails concernant ces déterminations dans les traités classiques (8). En définitive la somme des anions dosés individuellement doit être égale à la somme : acidité de titration + alcalinité des cendres.

Bilan d'une transformation. — Au cours d'un phénomène qui affecte la composition acidimétrique du vin, on peut établir le bilan de la transformation des acides. Si les analyses sont exactes et si l'on a vraiment dosé toutes les substances à fonction acide apparues ou disparues, la somme des variations des cations doit égaler la somme des variations des anions déterminés individuellement.

Dosage des cations. — L'acidité de titration a été titrée en utilisant la phénolsulfonephtaléine comme indicateur externe, selon la méthode de Gille (9). On titre ainsi jusqu'à pH 7,4. L'alcalinité des cendres a été

déterminée selon les prescriptions de JAULMES (10). Le cation ammonium a été dosé après déplacement par la magnésie suivant le mode opératoire décrit par PEYNAUD (11).

Dosage des anions. — L'acide phosphorique a été dosé par la méthode céruléo-molybdique de DENIGÈS (12), l'acide tartrique par la méthode KLING, modifiée par PEYNAUD (13), l'acide citrique par la méthode KOGAN, modifiée par PEYNAUD (14), l'acide malique par la méthode PEYNAUD par transformation en éthanal par oxydation manganique ménagée à pH 3,5 (15).

Pour ces deux dernières méthodes nous avons utilisé le nouveau mode opératoire de l'auteur, qui fait appel à la centrifugation pour la séparation du précipité des sels barytiques, à la place de la filtration. La centrifugation permet une séparation et un lavage des précipités plus rapides. De même, par simplification, on opère l'oxydation manganique des acides sur la totalité de la prise d'essai qui a servi à la précipitation. Il n'y a pas lieu de séparer le sulfate de baryum qui se forme lorsqu'on déplace les acides par l'acide sulfurique. Pour l'acide malique on pratique la précipitation sur 1 ou 2 cm^3 de moût ou de vin ; pour l'acide citrique on opère sur 25 cm^3. L'oxydation manganique est opérée avec le modèle d'appareil distillatoire déjà décrit (16) ou avec une variante de ce modèle dont on trouvera plus loin le croquis (fig. 1)

Méthode de dosage de l'acide lactique

La mise au point de cette méthode ayant fait l'objet d'une publication en 1950, nous en donnons simplement ici le principe et la description du mode opératoire auquel nous nous sommes arrêté.

La méthode repose sur l'oxydation quantitative de l'acide lactique en éthanal par oxydation manganique opérée à l'ébullition dans un appareil à distillation comportant un tube abducteur permettant l'écoulement goutte à goutte du permanganate très dilué. On titre l'éthanal formé par la méthode au sulfite, selon Jaulmes et Espezel. Une défécation préalable du vin écarte les autres acides organiques par précipitation plombique et les sucres par précipitation barytique dans l'alcool. Le 2,3 butanediol dont l'oxydation donne de même de l'éthanal, est chassé par évaporation à sec, l'acide lactique étant retenu à l'état de sel.

Mode opératoire. — 20 cm^3 de vin, dont la teneur en sucres ne doit pas dépasser 35 à 50 g par litre, placés dans un tube de centrifugeuse sont déféqués par 5 cm^3 d'acétate basique de plomb ($d = 1,23$). Si la richesse en sucres est plus grande, on opère une dilution préalable. On centrifuge. On prélève 5 cm^3 du liquide clair (correspondant à 4 cm^3 de

vin) et on les place dans une fiole jaugée de 50 cm³ contenant 4 g de baryte pure hydratée finement pulvérisée. On ajoute peu à peu de l'alcool absolu en agitant constamment pour éviter la prise en masse du précipité. On complète au trait de jauge avec de l'alcool, on attend 2 heures et on filtre ; un contact de 15 minutes, comme il avait été déjà indiqué, peut n'être pas suffisant dans le cas de vins très sucrés.

Pour doser l'acide lactique, on prélève 25 cm³ du filtrat alcoolique correspondant à 2 cm³ de vin. On fait passer, à l'aide d'un tube effilé un courant de gaz carbonique jusqu'à ce que le léger précipité formé se dissolve.

On chasse alors le 2,3 butanediol et l'alcool en évaporant à sec au bain-marie le liquide placé dans un bécher à fond plat. Dans les conditions indiquées, il n'y a pas de perte d'acide lactique qui est entièrement salifié ; après l'évaporation on se trouve à pH 6,4. On reprend la croûte blanche formée par 5 cm³ d'acide sulfurique N et on porte quantitativement liquide et précipité dans l'appareil d'oxydation.

On porte le liquide à l'ébullition et on laisse tomber le permanganate N/200 à raison d'une goutte toutes les deux secondes. On recueille le distillat dans un tampon de sulfite à pH 7. On poursuit la distillation nettement après que le liquide a pris une coloration brune indiquant la présence d'oxydes de manganèse. Puis on titre l'éthanal recueilli selon la méthode Jaulmes et Espezel en employant l'iode N/100.

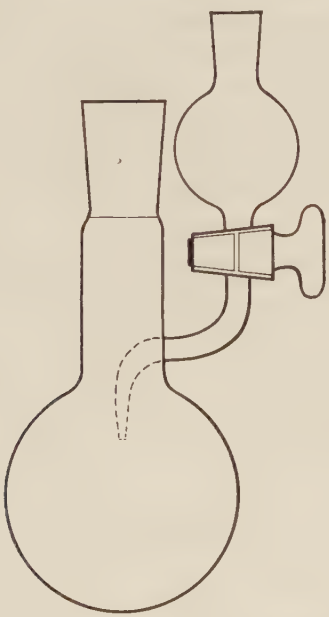


Fig. 1. — Appareil pour oxydation manganique.

1 cm³ d'iode N/100 correspond à 5 micromolécules, soit 0,45 mg d'acide lactique.

Méthode de dosage colorimétrique du glycérol

Nous avons étudié ailleurs en détail la mise au point de cette méthode de dosage que nous utilisons depuis 1950 (17). Notre but était l'établissement d'une technique permettant le dosage du glycérol dans les vins très liquoreux, ayant jusqu'à 100 g de sucres réducteurs par litre, et dans les moûts de raisin, en particulier dans les moûts provenant de raisins « pourris nobles », attaqués par le *Botrytis cinerea*. Nous en donnons ici le principe et le mode opératoire, tel que nous l'appliquons depuis plusieurs années.

La méthode est basée sur l'oxydation du glycérol en formol par l'acide periodique ; on effectue un dosage colorimétrique du formol apparu, à l'aide de l'acide chromotropique, réactif spécifique du formol. Une méthode fondée sur le même principe a été depuis publiée par Ournac (18).

La première partie du dosage consiste en une défécation conduite exactement selon les modalités décrites pour le dosage de l'acide lactique, et dont le but est d'écarter les substances génératrices de formol par oxydation periodique. Ces deux dosages débutent de la même façon. Il y a lieu simplement de ramener par dilution, avant défécation, la teneur en sucres aux environs de 40 g par litre.

Du reste, à cause de la grande sensibilité de la méthode l'oxydation finale ne doit porter que sur des quantités de glycérol voisines de 0,5 micromolécule dans la prise d'essai et une dilution de tous les vins, même secs, est nécessaire. On dilue habituellement 10 fois, puis on procède comme il a été indiqué pour l'acide lactique, à la double défécation plombique et barytique.

Une prise de 1 cm^3 du filtrat obtenu, mesurée avec une pipette de précision, et correspondant à 0,08 cm^3 de vin dilué, est portée dans un tube à essai bouchant à l'émeri, jaugé à 25 cm^3.

On oxyde par 1 cm^3 d'acide periodique N/50. On laisse poursuivre l'oxydation 15 minutes à la température du laboratoire, pas davantage, l'excès d'acide periodique et les iodates formés sont réduits par une solution sulfureuse contenant 1 g par litre d'acide sulfureux, introduite goutte à goutte. De l'iode est d'abord libéré et colore le liquide en jaune ; on poursuit les affusions de solution sulfureuse jusqu'à la goutte qui décolore définitivement le liquide.

On ajoute alors 5 cm^3 de réactif chromotropique préparé de la façon suivante : à 5 cm^3 d'une solution aqueuse d'acide chromotropique à 50 g par litre, on ajoute 100 cm^3 d'acide sulfurique très pur. Rappelons que la solution aqueuse chromotropique se conserve une dizaine de jours à la glacière à l'abri de la lumière ; elle ne doit d'ailleurs être utilisée que

24 heures après sa préparation. Le réactif chromotropique sulfurique doit être utilisé aussitôt après sa préparation.

Après l'addition du réactif, on chauffe le tube 30 minutes au bain-marie bouillant. Il se développe une coloration violette dont l'intensité est en rapport avec la teneur en formol. Après ce temps de chauffage, on refroidit, on complète à 25 cm³ avec de l'eau distillée, on mélange et on colorimètre avec un appareil sensible en lumière monochromatique verte (5400 angstroms). Nous avons utilisé pour ces mesures soit l'électrophotomètre de MEUNIER, soit l'absorptiomètre de DOGNON.

On a soin d'opérer chaque fois un essai à blanc avec tous les réactifs, en opérant sur 5 cm³ d'eau déféquée et oxydée de la même façon. On obtient toujours ainsi une légère coloration sur laquelle on règle le zéro de l'électrophotomètre. On trace la droite d'étalonnage une fois pour toutes, avec l'appareil utilisé, à partir de taux exactement connus de glycérol. La quantité de glycérol en micromolécules dans la prise d'essai multipliée par 125 donne le taux de glycérol en millimolécules par litre de vin lorsque le rapport de dilution est de 10.

Méthode de dosage de l'acide gluconique

La méthode que nous indiquons est également basée sur la production de formol par oxydation periodique de l'acide gluconique.

Dans les moûts ou les vins on écarte les pectines, les gommes et les polyphénols par une défécation préalable. On précipite l'acide gluconique, avec les autres acides, sous forme de sel de calcium dans l'alcool à 72° en milieu neutre. Il est à remarquer qu'aucun des acides organiques du vin qui sont oxydables par l'acide periodique, ne donne de formol. De façon à éliminer toute trace de sucre qui serait une cause importante d'erreur, on procède à une seconde précipitation de purification après dissolution du premier précipité. Le second précipité ainsi obtenu subit l'oxydation periodique et on termine par un dosage colorimétrique du formol apparu.

Il nous a été donné de faire connaître d'une manière très condensée, le mode opératoire de cette méthode (19). Nous reprendrons ici la discussion des opérations successives et donnerons les essais ayant servi à établir le mode opératoire définitif.

Oxydation periodique de l'acide gluconique. – L'action de l'acide periodique sur cet acide a été étudiée par FLEURY et LANGE (20), qui en ont donné la formule suivante :

$$CH_2OH\,(CHOH)_4COOH + 4\,IO_4H = H\cdot CHO + 3\,H\cdot COOH + CHO\cdot COOH + H_2O + 4\,IO_3H$$

Une molécule d'acide gluconique donne une molécule de formol

et une molécule d'acide glyoxylique, mais les auteurs n'avaient pas obtenu le rendement quantitatif en aldéhydes même après 6 heures de contact. Dans nos essais, conduits à partir du gluconate de calcium, nous avons obtenu en 15 minutes, par oxydation en milieu acide, des rendements en aldéhydes de 98 p. 100. Les fonctions aldéhydes peuvent être titrées par combinaison sulfitique et iodométrie. On obtient deux fonctions aldéhydes par molécule d'acide gluconique.

Par ailleurs, il est possible de déterminer spécifiquement le formol, à l'aide de la réaction chromotropique. On peut, à partir de quantités connues d'acide gluconique, établir une droite d'étalonnage permettant son dosage colorimétrique.

Tracé de la droite d'étalonnage. — On prépare une solution contenant exactement 1 méq d'acide gluconique par litre, en dissolvant 215 mg de

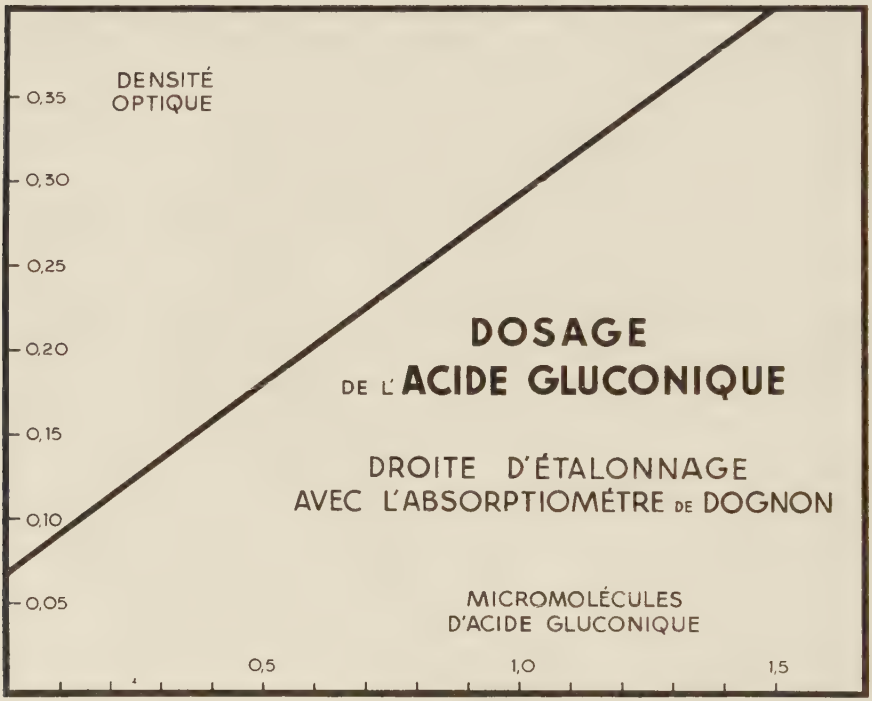


Fig. 2. — Droite d'étalonnage de l'acide gluconique.

gluconate de calcium dans un litre d'eau distillée. Dans des tubes à essais jaugés à 25 cm³ et munis de bouchons rodés, on introduit 0,1-0,25-0,50-0,75-1,00-1,25 et 1,50 cm³ de solution, correspondant aux mêmes valeurs en microéquivalents. On ajoute 1 cm³ d'acide periodique N/50, on agite et laisse en repos 15 minutes. On détruit alors l'excès d'acide periodique par une solution sulfureuse à 1 g par litre, ajoutée goutte à goutte jusqu'à

disparition de la coloration jaune, provenant de l'iode libéré. On ajoute 5 cm³ du réactif chromotropique, préparé comme il a été déjà indiqué pour le glycérol, et on porte 30 minutes au bain-marie bouillant. On refroidit, on complète à 25 cm³ avec de l'eau distillée et on mesure l'intensité de la couleur apparue à l'électrophotomètre de MEUNIER ou à l'absorptiomètre de DOGNON.

On construit ainsi la droite d'étalonnage que reproduit le graphique n° 2.

Séparation de l'acide gluconique à l'état de sel de calcium. — Dans le vin ou le moût, milieux complexes, l'acide gluconique doit être d'abord séparé des autres substances oxydables par l'acide periodique avec production de formol, en particulier des sucres. A cet effet on utilise la propriété du sel de calcium d'être insoluble dans l'alcool. Le gluconate de baryum est plus soluble que le gluconate de calcium, ainsi que le montrent les essais suivants. On a précipité en milieu neutre, à différentes concentrations en alcool, 10 cm³ d'une solution environ N/100 d'acide gluconique, par un excès d'ions baryum ou calcium. Le tableau I donne les proportions d'acide gluconique précipité.

TABLEAU I

Précipitation des gluconates de baryum et de calcium

On opère la précipitation sur 0,95 méq d'acide.

Titres alcooliques	Gluconate de baryum		Gluconate de calcium	
	Quantité précipitée	Rendement %	Quantité précipitée	Rendement %
20°	0,40	42	0,46	48
30°	0,55	58	0,58	61
40°	0,67	70	0,79	83
50°	0,80	84	0,94	99
60°	0,90	95	0,94	99
80°	0,94	99	0,94	99

On voit dans ce tableau que la totalité de l'acide gluconique est précipitée par le calcium dès 50° d'alcool, tandis qu'il faut un titre alcoolique de 80° pour obtenir le même résultat avec le baryum comme agent précipitant.

Il est à remarquer cependant que la bonne précipitation du gluconate de calcium exige la présence d'ions sodium dans la solution.

Conduite de la précipitation. — Les principaux constituants des moûts et des vins susceptibles de donner du formol par oxydation périodique, et de fausser ainsi le dosage, sont les sucres, le glycérol, les gommes,

les arabanes, les pectines, certains groupements protéiques, les flavones, les sucres, etc. Le glycérol n'est pas entraîné par précipitation, mais les gommes, les matières pectiques, sont précipitables par l'alcool, et doivent être au préalable éliminées. Ces substances conduiraient à la formation de formol en proportion telle que, comme nous avons pu le constater, leur présence fausserait le dosage de 20 à 30 p. 100. On les précipite dans l'alcool à 80° en milieu acidifié.

La séparation de l'acide gluconique d'avec les sucres pose certains problèmes. En effet, la précipitation à la neutralité par un excès d'ions calcium, entraîne toujours une petite quantité de sucres. L'erreur est importante, bien que le glucose et le lévulose soient oxydés beaucoup plus lentement que l'acide gluconique. En milieu alcalin, l'insolubilisation du sucre est encore plus forte, et il faut opérer exactement à la neutralité.

La quantité de sucre entraînée étant proportionnelle à la quantité de sucre initiale du milieu, on tourne cette difficulté en redissolvant le premier précipité et en renouvelant la précipitation de l'acide gluconique. Dans ces conditions les quantités de sucre entraînées sont négligeables, comme le montre le tableau II.

Nous avons opéré sur des milieux synthétiques contenant 250 g de sucres par litre, et présentant la composition acidimétrique des moûts,

TABLEAU II

Double précipitation du gluconate de calcium

Les chiffres sont des milliéquivalents

	Doses théoriques	Précipitation simple		Double précipitation	
		trouvé	erreur	trouvé	erreur
Milieu synthétique 1	10,0	10,2	0,2	9,6	— 0,4
Milieu synthétique 2	10,0	14,0	+ 4,0	9,5	— 0,5
Milieu synthétique 1	0	7,7	+ 7,7	0,2	+ 0,2
Milieu synthétique 2	0	4,3	+ 4,3	0,1	+ 0,1
Moût de raisin	0	5,7	+ 5,7	0,4	+ 0,4

ayant ou n'ayant pas reçu d'acide gluconique, et sur un moût provenant de raisins sains et probablement exempt d'acide gluconique.

Par deux précipitations successives on arrive donc à séparer d'une manière satisfaisante de petites quantités d'acide gluconique en face de très fortes concentrations en sucres.

Mode opératoire de la précipitation. — 5 cm³ de moût de raisin ou de vin, préalablement débarrassé des substances flavoniques et anthocyanes par traitement avec une minime quantité de charbon activé, sont

placés dans un tube de centrifugeuse. On ajoute 2 gouttes d'acide chlorhydrique pur, puis 20 cm³ d'alcool absolu. On mélange et on laisse en glacière 24 heures. Après ce temps on centrifuge, on lave le précipité à l'alcool et on recueille tous les liquides dans un autre tube de centrifugeuse où on effectue la précipitation. Pour ce faire, on ajoute 1 cm³ de chlorure de calcium à 20 %, puis goutte à goutte une solution alcaline — 100 cm³ d'ammoniaque à 22°B, 40 g de soude par litre — jusqu'au virage de la phénolsulfonephtaléine. On mélange et on laisse 4 heures à la glacière. Le précipité obtenu est séparé par centrifugation, lavé à deux reprises avec 10 cm³ d'alcool à 72°. On l'égoutte, on le reprend par 5 cm³ de solution chaude d'acide chlorhydrique environ N/2. La dissolution est rapide.

On renouvelle alors la précipitation en ajoutant 1 cm³ de la solution de chlorure de calcium et de la solution alcaline jusqu'au virage de la phénolphtaléine. On introduit 25 cm³ d'alcool à 96°. La coloration rose disparaît, mais le pH doit rester aux environs de 8 (en tout cas le bromothymol bleu doit rester bleu dans un essai à la touche). On mélange, on laisse de nouveau en repos 4 heures à la glacière. Ce nouveau précipité, séparé par centrifugation, est lavé par 10 cm³ d'alcool à 72°. Il est bien égoutté et entraîné par un jet de pissette d'eau distillée, à l'aide d'un entonnoir, dans un flacon jaugé de 50 cm³.

TABLEAU III

Exactitude de la méthode de dosage de l'acide gluconique

Les chiffres d'acide gluconiques sont des milliéquivalents

	Sucres réducteurs g	Acide gluconique ajouté	Chiffre trouvé	Chiffre théorique	Différence
Milieu synthétique	250	10,0	9,4	10,0	— 0,6
Moût n° 1	165	0	1,2		
		10,0	10,8	11,2	— 0,4
Moût n° 2	220	0	0,7		
		5,0	5,6	5,7	— 0,1
		10,0	10,0	10,7	— 0,7
Moût n° 3	177	0	9,7		
		10,0	18,4	19,7	— 1,3
Moût n° 4	288	0	3,2		
		5,0	8,2	8,2	— 0,1
		10,0	12,1	13,2	— 0,9

Avant de compléter au trait de jauge, on acidifie par 5 cm³ d'acide sulfurique au tiers et on mélange. C'est sur ce liquide qu'on effectue

l'oxydation periodique selon les modalités déjà décrites. Suivant la teneur en acide gluconique, on opère sur 1 ou 2 cm^3 de ce liquide, contenant l'acide gluconique de 0,1 ou 0,2 cm^3 de moût ou de vin.

Nous avons vérifié l'exactitude de cette méthode en opérant sur des milieux synthétiques de richesse connue en acide gluconique et sur des vins et des moûts additionnés de quantités connues du même acide. Comme le montre le tableau III, on retrouve assez bien les chiffres théoriques. Les erreurs les plus fortes, généralement par défaut, sont de l'ordre du milliéquivalent par litre, l'erreur moyenne du demi-milliéquivalent.

CHAPITRE II

ÉTUDE DE LA SURMATURATION DU RAISIN PAR BOTRYTIS CINEREA (Pourriture noble)

Dans ce chapitre nous étudions les transformations dont la baie de raisin est le siège sous l'influence de la « pourriture noble «. Cette forme particulière de surmaturation est la conséquence de l'envahissement de la baie de raisin par un champignon microscopique : le *Botrytis cinerea*. Des cultures de *Botrytis cinerea* au laboratoire ont permis d'étudier la physiologie de ce champignon. Nous déterminons la combustion du sucre et des acides qu'il provoque, et les conséquences de ces transformations sur la composition acidimétrique du jus de raisin sont mises en valeur. Les formations de glycérol et d'acide citrique sont étudiées. D'autre part on montre que le *Botrytis cinerea* forme dans les raisins de l'acide gluconique. La composition très particulière des grands vins blancs liquoreux est finalement le reflet de l'action de *Botrytis cinerea* sur le raisin.

On peut envisager plusieurs définitions de la surmaturation du raisin. La première correspond à cette période qui suit la maturation proprement dite et dans laquelle, les échanges étant coupés avec la plante, le raisin est soumis à un phénomène de consomption. La surmaturation peut être encore provoquée sous l'action de la chaleur solaire ou artificielle. Elle fait alors l'objet de vinifications spéciales (vin jaune, vin passerillé, etc) ou d'enrichissement du moût (1). Mais c'est la surmaturation du raisin obtenue grâce à la pourriture noble qui nous intéresse plus particulièrement ici.

La « pourriture » du raisin est le résultat du développement de champignons microscopiques sur la baie. Elle est dite « noble » lorsqu'elle entraîne une amélioration de la qualité de la récolte ; elle est dite « vulgaire » dans le cas contraire.

Le champignon responsable de la pourriture noble est le *Botrytis cinerea*, la photo ci-contre montre une grappe de raisin présentant tous les degrés de développement de la pourriture. Lorsque *Botrytis cinerea* attaque un grain, il commence par former une ou plusieurs taches circulaires sur la pellicule ; ces taches se développent jusqu'à recouvrir entièrement la surface du grain. La pellicule est modifiée, elle devient fragile, de couleur brune et se ternit. Comme l'indique LABORDE (2), qui a étudié la pourriture noble en Gironde, on appelle les grains rendus à ce stade, grains « pourris pleins ». (On peut voir de tels grains à droite en haut de la photo.) Lorsque l'action de la moisissure est prolongée, le grain apparaît ridé, comme ratatiné. Si la pourriture s'est développée par temps humide, les grains

portent des houppes grisâtres plus ou moins abondantes. Par contre si les conditions de température et d'humidité sont défavorables au développement aérien du champignon, le grain peut se flétrir et se dessécher

Fig. 3. — Grappe de raisin atteinte de pourriture noble.

sans qu'apparaissent ces houppes. On désigne ces grains sous le terme de grains « rôtis ».

La propagation de *Botrytis cinerea* se fait soit par contamination par les spores, soit par le contact d'un grain pourri avec un grain sain. L'envahissement d'un vignoble est habituellement lent, il est fonction des

conditions d'humidité et de température, mais il est rare qu'il soit complet d'un même coup. C'est l'alternance de périodes humides et de périodes ensoleillées qui favorise le développement de la pourriture noble. La formation de grains « rôtis » s'étale généralement sur plusieurs jours, voire quelques semaines. En conséquence les vendanges se font en plusieurs fois. On cueille par « tries » successives, en ne ramassant que les grappes ou les fractions de grappes ayant atteint un degré suffisant de pourriture. En 1950, l'envahissement a été rapide et on n'a souvent opéré que deux tries. En 1951 la pourriture se développa plus lentement ; elle intervint sur des raisins manquant généralement de maturation et le nombre de « tries » a été de quatre ou cinq. En 1953 une première « trie » du tiers de la récolte a donné, grâce à une période de temps exceptionnelle, des moûts particulièrement riches. Mais à cause du mauvais temps de fin octobre, plusieurs tries ont été ensuite nécessaires pour ramasser le complément de la récolte. Généralement on élimine par une trie de nettoyage les grains de moins bonne qualité. Les tries suivantes donnent les « vins de tête ». La dernière cueillette fournit un « vin de queue » de moins bonne qualité.

La réduction du volume de la récolte sous l'influence de la pourriture noble atteint jusqu'à 50 p. 100. L'obtention de la qualité est conditionnée par une diminution de rendement et on conçoit que les vins obtenus par ce procédé puissent atteindre des prix très élevés, et que l'on ne pratique une telle méthode que lorsqu'elle se justifie. Le *Botrytis cinerea* peut se développer dans tous les vignobles au cours des vendanges tardives, principalement dans les années pluvieuses. Mais les régions où l'on peut profiter des avantages de la pourriture noble pour augmenter la qualité des vins sont peu nombreuses. Sur les bords du Rhin, la pourriture noble est connue depuis longtemps (3) et on fait remonter vers 1800 les premières récoltes de raisins pourris. Dans le Sauternais, d'après LABORDE, c'est seulement vers la moitié du siècle dernier que l'on a commencé à faire des vins d'une manière générale avec le concours de la pourriture noble. Depuis, cette pratique s'est beaucoup répandue en Gironde, principalement le long des deux rives de la Garonne, au sud de Bordeaux. Souvent dans la région des Graves, région productrice de vins secs ou demi-secs, les producteurs laissent pourrir le raisin, mais c'est dans la région de Sauternes et les communes avoisinantes [1], et de l'autre côté de la Garonne, à Sainte-Croix-du-Mont, que la pourriture noble a, pour ainsi dire, son terrain d'élection. Dans les autres régions productrices de vins blancs, la pourriture des raisins est considérée comme dangereuse. Il en est toujours ainsi du reste pour les vins rouges, la pourriture aboutissant à la perte complète de la couleur. De même en Charente, elle revêt toujours la forme

[1] On sait que l'appellation Sauternes n'est donnée qu'aux vins provenant de cinq communes ; Sauternes, Bommes, Fargues, Preignac et Barsac.

vulgaire (4) et les eaux-de-vie préparées à partir de moûts pourris sont de mauvaise qualité. On s'est donc particulièrement occupé à la Station Viticole de Cognac (5) de rechercher un traitement des raisins en vue d'empêcher le développement de la pourriture lors des années propices aux invasions.

I. — Historique des connaissances sur la pourriture noble

Les premières recherches sur les modifications chimiques provoquées par la pourriture noble, semblent avoir été faites par Neubauer (6), en Allemagne, et datent de 1869. En 1888, Müller-Thurgau (7) a publié une étude d'ensemble du sujet d'après des observations et des analyses faites à la récolte de 1883 et aux suivantes, dans les vignobles du bord du Rhin. Nous verrons qu'en ce qui concerne l'étude botanique, biochimique et œnologique de la pourriture noble, les travaux de cet auteur restent les plus importants.

Étude botanique de la pourriture noble

Müller-Thurgau a montré que l'agent spécifique de la pourriture noble est *Botrytis cinerea* Pers. Dans la forme la plus courante de la pourriture du raisin, dite vulgaire, on peut constater parfois, à côté de *Botrytis cinerea*, l'apparition de *Penicilliums*, d'*Aspergillus* et de *Mucors*. Ces moisissures entrent en compétition avec *Botrytis cinerea*. Lorsque les *Penicilliums* dominent, ils provoquent la pourriture « verte » étudiée par Müller-Thurgau. Lorsque l'humidité ou les pluies sont abondantes, le raisin se gonfle et éclate. Il peut alors être attaqué par des bactéries oxydantes, véhiculées très souvent par les insectes ; on observe alors une pourriture « acide ».

Le *Botrytis cinerea* est la forme conidifère de *Sclerotinia fuckeliana*, moisissure microscopique très répandue dans la nature. Elle vit en saprophyte sur un grand nombre de matières organiques et en parasite sur divers organes végétaux parmi lesquels les fruits et les raisins. Le mycélium du champignon observé au microscope lors de son développement sur le grain de raisin, montre des houppes constituées par de gros tubes se ramifiant au sommet sous forme arborescente. Lorsque le développement de la moisissure est assez avancé, on aperçoit aux extrémités ; des grappes très nombreuses formées de conidies. De ces conidies se détachent des spores ovoïdes. Lorsque les conditions sont favorables, ces spores germent en émettant des tubes mycéliens qui s'implantent dans la pellicule des grains sains.

Au point de vue botanique *Botrytis cinerea* a un cycle végétatif assez compliqué (8) donnant lieu à des phénomènes d'hétérocaryose (9). Une

conidie du type polynucléaire, donc hétérogénétique, peut donner trois types de spores : deux homotypes par suite d'une nouvelle division anormale, et un troisième hétérotype semblable à la conidie mère. De plus les tubes mycéliens originaires de différents types de spores, peuvent donner lieu, en se soudant, au phénomène d'anastomose et donner ainsi des combinaisons variées. Barnes (10) signale les variations de caractères morphologiques obtenues par élévation de température.

Récemment Pesante (11) a étudié au point de vue morphologique et physiologique quelques souches de provenances diverses. Il conclut que le *Botrytis cinerea* ne doit pas être considéré comme une entité systématique génétiquement homogène. Au contraire nombreuses sont les variantes morphologiques et physiologiques rencontrées. Il n'a pas été possible de démontrer une corrélation entre les diverses activités et ceci peut être dû à l'existence de sous-espèces ou même à des phénomènes d'hétérocaryose par cellules polynucléaires capables de donner naissance à des phénotypes susceptibles de combinaisons variées.

Étude physiologique du Botrytis cinerea

Les travaux sur la physiologie du *Botrytis cinerea* ont eu pour origine deux préoccupations différentes : l'une reste dans le cadre de la physiologie générale des champignons, l'autre plus pratique que spéculative recherche dans ces travaux l'explication des faits observés lors du développement de la pourriture noble des raisins.

Les études se rapportant à la première catégorie sont très nombreuses et notre intention n'est pas d'en donner une analyse complète. Elles ont conduit à des monographies, tel que l'ouvrage de Foster (12). Comme toutes les moisissures, *Botrytis cinerea* possède un catabolisme oxydatif et est très riche en ferments de toutes sortes. Rippel et Heilmann (13) ont montré que le gaz carbonique était non seulement un stimulant de la nutrition de *Botrytis cinerea* et des moisissures du même genre, mais aussi un véritable aliment. Cette propriété relie le métabolisme des hétérotrophes de celui des autotrophes. La fermentation citrique des oses par les moisissures a donné lieu à un grand nombre de travaux. Nous noterons ceux de Chrzaszcz et de ses collaborateurs (14) qui ont observé la formation d'acide citrique par *Botrytis cinerea* à partir des acides acétique et lactique et de l'alcool éthylique.

Le nombre de diastases identifiées dans le mycélium de *Botrytis cinerea* est très grand. Laborde, un des premiers, a établi la présence d'oxydases, qui conduisent au brunissement de la peau du raisin et qu'il dénommait « œnoxydase ». Elle n'est pas détruite par la fermentation alcoolique. Il s'agit en réalité d'un complexe de ferments oxydatifs parmi lesquels on a identifié la tanase ou polyphénoloxydase, la laccase, la

catalase, la glucoseoxydase, l'acide ascorbiqueoxydase. Tombesi et Fortini (15) ont déterminé, par un dosage chimique, la teneur en oxydase des raisins pourris ; ils ont développé les conséquences de sa présence dans les moûts de raisin, sur les phénomènes d'oxydoréduction au cours de la fermentation. *Botrytis cinerea* possède encore la pectase et la pectinase qui lui permettent d'hydrolyser les pectines (16), la protéase, l'uréase, etc. Colin (16 *bis*) a consacré sa thèse de doctorat à l'étude particulière de l'hydrolyse des polysaccharides par *Botrytis cinerea*.

L'activité de *Botrytis cinerea* est surtout caractérisée par des combustions profondes du substrat. Müller-Thurgau montra que *Botrytis cinerea* cultivé sur moût de raisin, consommait à la fois le sucre et l'acidité. Mais contrairement au *Penicillium*, les acides disparaissent beaucoup plus que les sucres. Parmi les acides du raisin, c'est principalement l'acide tartrique qui est attaqué. Ces faits ont été confirmés par Behrens (17). Cependant Windisch (18) indique que c'est surtout l'acide malique qui disparaît. Récemment Garino-Canina et ses collaborateurs (19) ont observé dans des cultures sur moûts de raisin et lors de la surmaturation des raisins servant à la vinification du « Passito di Caluso », une diminution de l'acide tartrique beaucoup plus forte que celle de l'acide malique.

Laborde a constaté la formation de glycérol par le *Botrytis cinerea* cultivé sur moût de raisin (20). Il a remarqué que le glycérol formé dans les premiers jours de culture disparaissait par la suite. Il a de même reconnu la présence du glycérol dans les moûts provenant de raisins pourris. Le même auteur a montré que *Botrytis cinerea* forme dans le raisin ou dans son milieu de culture, un mucilage soluble : la dextrane.

Plus récemment Schoen et Ekrem Eras (21) ont signalé que *Botrytis cinerea* formait des quantités élevées de mannitol à partir du glucose.

Enfin, d'après les travaux de Ribéreau-Gayon, E. Peynaud et S. Lafourcade (22), les différentes souches de *Botrytis* se montrent capables de sécréter d'une part des substances antibiotiques pour la levure qui diffusent en grande partie dans le moût et se retrouvent encore dans le mycélium, d'autre part des substances accélérant la fermentation et favorisant la croissance, qui restent dans le mycélium lavé. Ces observations expliquent les irrégularités de fermentation des raisins plus ou moins pourris.

Étude œnologique de la pourriture noble

Dans son étude très étendue, Müller-Thurgau a fait de nombreuses observations d'un intérêt œnologique certain pour la production des vins liquoreux. Il insiste sur le fait qu'il n'y a vraiment pourriture noble que lorsque *Botrytis cinerea* intervient sur des raisins très mûrs, même légèrement surmûris. Au cours de la pourriture le poids des grains pourris dimi-

nue constamment par perte d'eau ; grâce à cette concentration, la quantité de sucre contenue dans les moûts de raisins pourris est supérieure à celle des moûts de raisins sains. C'est en général l'inverse pour l'acidité : les raisins pourris sont moins acides ou ne sont pas plus acides que les raisins sains. Si l'on considère la quantité absolue de sucre d'une vendange saine, on constate toujours qu'elle est supérieure à celle d'une vendange pourrie ; il en est de même pour les acides libres. Müller-Thurgau fut l'un des premiers à montrer que la grande densité des moûts pourris n'était obtenue que par une perte souvent importante du sucre, lorsqu'on envisage la totalité de la récolte.

D'après Behrens (23) l'action finale du *Botrytis* sur l'acidité des moûts est assez variable et dépend de la concentration, c'est-à-dire des conditions météorologiques, de l'intensité de la combustion des acides, de la date des vendanges, et surtout du moment où le *Botrytis* intervient.

Ventre (24) pense également que « la pourriture est noble ou grise suivant le temps qu'il fait ». Cet auteur représente l'enrichissement du degré de sucre par le rapport $\frac{S - s}{V - v}$ dans lequel S est la quantité de sucre du raisin et s la quantité de sucre détruit par *Botrytis cinerea*, V le volume de jus de raisins et v l'évaporation de l'eau. Lorsque le temps est sec $V - v$ devient faible tandis que s reste sensiblement constant. Il y a à ce moment concentration et amélioration de la qualité. Si le temps est humide, non seulement s augmente par suite du développement de la pourriture, mais il y a souvent entrée d'eau et finalement appauvrissement du moût en sucre.

D'après cet exposé de nos connaissances sur la pourriture noble, on se rend compte que les observations pour les grands vins blancs de Bordeaux sont relativement peu nombreuses. Les seules analyses connues sont celles que Laborde a faites dans le Sauternais il y a plus de quarante ans, et dont voici extrait de son Cours d'Œnologie, un exemple des résultats :

	Cru n° 1			Cru n° 2		
	grains sains	grains pourris plein	grains rôtis	grains sains	grains pourris plein	grains rôtis
Sucre en g/l	230	263	385	220	230	339
Acidité en g/l	2,55	2,72	2,20	3,00	2,94	2,20

Au point de vue des transformations propres à chaque acide, nous avons vu que les conclusions restaient encore divergentes. D'autre part bien que Pesante ait observé des différences morphologiques entre souches, il reste à étudier les possibilités de classification physiologique.

Du reste tout le comportement du *Botrytis cinerea*, et en particulier la production de glycérol et éventuellement de l'acide citrique, mériteraient d'être approfondis. Nous avons donc envisagé l'étude systématique de la physiologie de *Botrytis cinerea* et de la pourriture noble comportant des analyses détaillées et complètes exprimées sous forme de bilans. Dans une première série d'expériences nous avons tenté de préciser les transformations produites dans le moût de raisin servant de milieu de culture au *Botrytis cinerea*. Dans une deuxième série, nous avons suivi au vignoble les variations de la composition du raisin au cours de la surmaturation par la pourriture noble. Enfin, dans une troisième partie, nous avons relié la composition acidimétrique des grands vins du Sauternais aux phénomènes observés lors de la surmaturation par le *Botrytis*.

II. — Transformations produites par *Botrytis cinerea* cultivé sur moût de raisin

Nous avons disposé pour cette étude de 6 souches de *Botrytis cinerea* d'origines diverses. L'une d'elles a été isolée d'un raisin pourri, cueilli dans la région de Sauternes. Nous avons opéré cet isolement de la manière suivante : un fragment de pellicule d'une baie de raisin est prélevé et placé dans une boîte de Pétri, contenant du moût de raisin gélosé à 10 p. 100 et stérilisé. Après quelques jours de conservation à l'étuve à la température de 25°, on observe les premiers développements des tubes mycéliens, sous forme d'une houppe blanchâtre. A ce moment on prélève aseptiquement au fil de platine un peu de mycélium et on le transporte sur une autre boîte de Pétri. Par plusieurs repiquages, effectués de cette façon, on évite la présence de levures, et on obtient une souche homogène de *Botrytis cinerea*. On s'assure de l'absence de levures en cultivant la souche isolée sur milieu sucré liquide. On conserve les cultures sur moût gélosé, en tubes inclinés, ou en erlenmeyer sur moût liquide. Dans ce dernier cas, l'ensemencement se fait avec une suspension de spores. Dès que les conidies sont formées, ce qui est indiqué par la teinte grise que prend le mycélium, on agite la culture et les spores se détachent dans le liquide. On ensemence aseptiquement le milieu stérilisé avec quelques gouttes de cette suspension de spores. Au bout de quelques jours, il apparaît en surface de très nombreuses taches blanches. Ces taches se développent et la surface du moût se recouvre rapidement d'un voile épais et touffu, sorte de feutrage qui continue à s'épaissir en formant une membrane que la dextrane rend visqueuse à la partie inférieure immergée. D'abord blanc, le mycélium devient rapidement grisâtre par formation de conidies. Suivant les souches de *Botrytis cinerea*, il existe du reste des variantes à cet aspect. Les cultures s'effectuent également très bien sur moût de bière, avec un développement un peu plus rapide.

Les autres souches qui ont servi à nos études, proviennent de raisin blanc, de pomme et du fruit de *Diospyros kaki* ; nous les devons à l'Institut de microbiologie de Pérouse (Prof. T. Castelli). Deux autres souches, *Botrytis cinerea* Pers. et *Botrytis cinerea* Pers. *albino sclerotia*, nous ont été fournies par le Centraalbureau voor Schimmelculture de Baarn (Prof. Kluyver). Pour la facilité de l'exposé, nous désignons ces souches dans le texte et dans les tableaux par les numéros suivants :

N° 1. — Souche isolée de raisins de Sauternes.
N° 2. — Souche isolée de raisin blanc.
N° 3. — Souche isolée de pomme.
N° 4. — Souche isolée du fruit de *Diospyros kaki*.
N° 5. — *Botrytis cinerea* Pers.
N° 6. — *Botrytis cinerea* Pars. *albino sclerotia*.

Ces souches étaient conservées par repiquages fréquents sur moût de raisin, dès la formation de conidies. Elles se développent très bien sur moût de raisin, bien qu'un peu plus lentement pour les souches N° 3 et 4. La souche N° 4 donne des cultures de couleur très foncée, presque noires lorsqu'elles vieillissent ; par contre la souche N° 6 reste toujours blanchâtre.

Nos expériences sur la transformation du moût de raisin par ces souches ont été effectuées dans des ballons sphériques d'un litre, à col large et court, obturés par un épais tampon d'ouate. Le diamètre du col étant de 5 à 6 cm, les échanges gazeux avec l'air extérieur se font facilement. On se trouve par conséquent toujours dans des conditions d'aérobiose suffisante et le manque d'oxygène n'est jamais un facteur limitant. La quantité de moût de raisin utilisée était de 400 cm^3 représentant une épaisseur de liquide de 5 à 6 cm. Le *Botrytis* se développait à la surface du moût, nous n'avons jamais fait de cultures immergées.

Pour ne pas surcharger notre exposé de tableaux de chiffres, nous commenterons ici, à titre d'exemple, les résultats obtenus dans deux cas extrêmes. Dans une première série d'essais, qui fut par la suite souvent répétée, on a suivi par l'analyse détaillée la transformation, en fonction du temps, de moûts de raisin servant de milieux de cultures à quatre souches. Deux moûts d'origines et de compositions différentes ont servi à ces essais. L'un est un moût de raisins rouges, préparé par nous-même, titrant 11°5 Baumé et présentant une acidité de titration très élevée : 7,35 g en acide sulfurique pour un pH de 2,98, conservé par pasteurisation en bouteilles bouchées de liège. L'autre est un moût de raisin blanc, muté à l'acide sulfureux, qu'on désulfite avant l'emploi, pesant 14°5 Baumé et caractérisé par une acidité de titration très basse : 2,25 g et un pH de 3,75.

Pour chaque souche, on ensemence plusieurs ballons, exactement dans les mêmes conditions, de façon à avoir des développements bien

Tableau IV

Cultures de différentes souches de Botrytis cinerea

Moût de raisins rouges : 11°5 et 7,35 d'acidité de titration

Nombre de jours de culture	Poids mycélium g	Sucres g	pH	Acidité totale	Alcalinité des cendres	NH_4	*Somme des cations*	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique	*Somme des anions*	Différence
COMPOSITION DU MOUT DE CULTURE												
		209	2,98	169	34	2,6	*206*	120	81	3,2	*204*	— 2
SOUCHE N° I												
13	3,7	160	3,06	100	29	0,2	*129*	73	57	2,6	*133*	+ 4
18	4,8	150	3,2	72	32	0,2	*104*	53	44	2,7	*100*	— 4
38	7,5	131	4,18	13,5	38	0	*51*	30	22	2,4	*54*	+ 3
SOUCHE N° II												
13	4,4	172	3,01	117	32	0,2	*149*	94	60	2,8	*157*	+ 8
18	5,0	152	3,51	104	32	0,1	*136*	81	48	5,1	*134*	— 2
38	7,7	131	3,51	58	37	0	*95*	43	41	5,4	*89*	— 6
SOUCHE N° III												
13	4,4	174	3,02	132	37	0,3	*169*	95	65	5,6	*166*	— 3
18	4,6	153	2,95	131	33	0,2	*164*	89	61	11,6	*162*	— 2
38	7,3	123	3,10	110	37	0	*147*	64	43	27,5	*134*	— 13
SOUCHE N° V												
13	4,9	151	3,22	77	42	0	119	52	32	16,5	*100*	— 19
18	6,5	131	3,50	60	36	0	96	36	26	20	*82*	— 14
38	9,0	101	4,20	23,5	34	0	57	4	0	27	*31*	— 26

Sauf indication spéciale les chiffres sont des milliéquivalents par litre.

Tableau V

Cultures de différentes souches de Botrytis cinerea

Moût de raisins blancs : 14,5 et 2,25 g d'acidité de titration

Nombre de jours de culture	Poids mycélium g	Sucre g	pH	Acidité totale	Alcalinité des cendres	NH_4	*Somme des cations*	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique	Acide acétique	*Somme des anions*	Différence
							COMPOSITION DU MOUT DE CULTURE						
		260	3,75	46	45	4,5	*95*	52	30	4	0	*86*	— 9
							SOUCHE N° I						
10	4,5	221	3,79	27	48	0,6	*76*	35	18	4	0	*57*	— 19
20	8,5	209	4,03	27	50	0,6	*78*	23	13	6	3	*45*	— 33
30	12	174	4,17	21	49	0,4	*70*	18	12	8	0	*38*	— 32
40	17	158	4,82	16	49	0,2	*65*	9	9	14	2	*34*	— 31
							SOUCHE N° II						
10	4	218	3,42	39	48	1,0	*88*	48	23	5	0	*76*	— 12
20	9	170	3,70	60	42	0,7	*103*	36	11	12	1	*60*	— 43
30	14	158	—	67	50	0,6	*118*	29	10	17	2	*58*	— 60
40	24	135	3,72	74	45	0,4	*119*	14	9	29	1	*53*	— 66
50	28	124	3,35	97	50	0,2	*147*	8	8	26	2	*44*	— 103
							SOUCHE N° III						
10	5	228	3,40	45	48	0,9	*94*	50	22	5	0	*77*	— 17
20	8	175	3,24	89	55	0,6	*144*	37	15	36	1	*89*	— 55
30	14	152	3,38	115	51	0,4	*166*	38	12	36	2	*88*	— 78
40	20	137	3,39	97	52	0,4	*149*	18	11	38	1	*68*	— 81
							SOUCHE N° V						
10	2	242	3,70	42	47	1,1	*90*	48	24	4	2	*78*	— 12
20	5	203	3,67	44	46	0,7	*91*	30	20	9	3	*62*	— 29
30	10	180	3,67	55	47	0,6	*103*	21	17	13	1	*52*	— 51
40	15	158	3,42	67	51	0,3	*118*	17	14	20	2	*53*	— 65
50	23	139	3,38	96	51	0,2	*147*	9	12	24	0	*55*	— 92

Sauf indication spéciale les chiffres sont des milliéquivalents par litre.

parallèles. Après divers temps de culture notés à partir du moment où le mycélium commence à se développer on décante le liquide d'un ballon, on le filtre et on procède à l'analyse de ce moût. Les cultures des derniers ballons ont duré 40 à 50 jours, à la température de 22° environ.

Les tableaux IV et V donnent les résultats obtenus en ce qui concerne l'évolution des sucres réducteurs et des acides organiques. On indique le poids du mycélium récolté sur les 400 cm³ de jus, après séchage à l'étuve à 100° jusqu'à poids constant, qui donne une idée de l'importance du développement.

Combustion des sucres

On observe que les teneurs en sucres réducteurs diminuent constamment durant la culture. En 40 jours la moitié du sucre initial a disparu. L'importance de cette combustion est assez bien en rapport avec le développement du mycélium. Sur le moût de raisin acide, où la croissance du mycélium est plus faible et semble limitée par un taux d'azote insuffisant, les quatre souches étudiées se comportent de la même façon, elles utilisent les mêmes quantités de sucre pour une récolte de mycélium du même ordre. Sur le moût de raisin peu acide, les poids secs de *Botrytis* sont beaucoup plus élevés et la diminution du sucre beaucoup plus forte. Ici, les souches se différencient et ce sont celles qui se développent le plus abondamment qui font disparaître la plus grande quantité de sucre. Ceci est, du reste, logique puisque sur moût de raisin *Botrytis cinera* prend surtout l'énergie nécessaire à son développement dans la combustion respiratoire des sucres. On peut calculer qu'il a fallu suivant les diverses conditions de 3 à 5 g de sucre pour former 1 g de mycélium sec.

Les dosages individuels de glucose et de lévulose au polarimètre, que nous n'avons pas reportés dans les tableaux, montrent que c'est le glucose qui est brûlé de préférence. Le rapport glucose /lévulose diminue régulièrement. Pour un moût, il passe de 0,87 à 0,72 après un mois de culture, et pour un autre de 1,03 à 0,76. Ces résultats confirment donc entièrement les observations faites par d'autres auteurs à ce sujet. C'est d'ailleurs une loi qui ne présente que peu d'exceptions, que le glucose est métabolisé par les cellules par fermentation ou respiration, plus facilement que le lévulose.

Évolution de l'acidité de titration

Cette évolution est extrêmement variable d'une souche à une autre ; elle dépend aussi beaucoup de l'acidité totale du milieu. Sur moût acide, la souche N° 1 détruit la presque totalité de l'acidité en 38 jours de culture. L'acidité de titration passe de 169 méq à 13,5 méq seulement, tandis que dans les mêmes conditions, la souche N° 3 laisse encore 113 méq par litre

d'acidité. Les souches se classent dans l'ordre décroissant suivant en ce qui concerne la combustion des acides : n° 1, n° 5, n° 2, n° 3.

L'allure du phénomène est tout autre avec le moût pauvre en acidité. Seul le *Botrytis* N° 1 a continué à faire baisser l'acidité ; tandis qu'elle remonte plus ou moins vite avec les autres souches, pour être doublée, et dans un cas même presque triplée, après 30 à 40 jours de culture.

En résumé, sur moût de pH bas, il y a eu toujours désacidification ; sur moût de pH élevé, il y a eu généralement acidification, et ces variations en sens inverse, peuvent avoir une grande amplitude. On conçoit dès maintenant qu'il peut exister au vignoble des souches qui font baisser l'acidité du raisin, tandis que d'autres, acidogènes, conduisent à un autre genre de pourriture en augmentant l'acidité. Ceci permet d'expliquer les données contradictoires de plusieurs auteurs et permet de comprendre aussi que la pourriture des raisins, par la grande diversité des conditions, peut produire des effets diamétralement opposés.

Combustion des acides tartrique et malique

Ces deux acides du moût de raisin sont fortement attaqués, et, ce qui est important à souligner, à peu près dans les mêmes proportions. Si l'on trace les courbes de l'évolution de ces deux acides, on obtient des tracés parallèles. Ceci semble en désaccord avec ce qui a été indiqué par d'autres auteurs et avec ce que nous observerons au prochain paragraphe dans les analyses comparatives de raisins sains et pourris, desquelles il ressort que c'est l'acide tartrique qui disparaît beaucoup plus vite que l'acide malique. Nous essaierons plus loin de donner une explication à ces contradictions.

Après 20 jours de culture ces deux acides ont diminué en moyenne de moitié et c'est là la cause de l'abaissement de l'acidité totale enregistrée. Chaque souche montre cependant un comportement différent. C'est la souche N° 5 qui paraît à ce point de vue la plus active ; après 38 jours la teneur en ces acides est ramenée pratiquement à zéro, dans un cas où au départ il y avait respectivement 120 et 81 méq par litre des acides tartrique et malique. La souche N° 2, par contre, est celle qui attaque le moins ces acides, puisque dans les mêmes conditions, elle n'a diminué leur taux que de 50 p. 100.

Dans les conditions de la pourriture du raisin au vignoble, la durée de l'attaque n'excède pas une dizaine de jours. Ce délai a été suffisant dans nos cultures pour abaisser de 20 à 50 p. 100 le taux de ces deux acides.

Formation d'acide citrique

Sur moût de raisin peu acide, on observe que la formation d'acide citrique a été générale, la souche N° 3 a produit 34 méq de cet acide, soit

plus de 2 g par litre ; la souche N° 1 forme des quantités plus faibles, mais encore importantes.

Très différent est le comportement du *Botrytis* sur le moût de raisin acide. Ici l'acidogenèse est beaucoup plus faible. Si les souches N° 3 et 5 forment encore 24 méq d'acide citrique, la formation est très limitée avec la souche N° 2 et tout à fait nulle avec la souche N° 1.

La production d'acide citrique est donc d'abord une caractéristique de la souche de *Botrytis* ; elle est exaltée par une culture à pH élevé.

On a l'explication de l'évolution de l'acidité de titration commentée dans un paragraphe précédent et on comprend les résultats contradictoires obtenus par les auteurs qui ont étudié cette question, en particulier, Blarez, Denigès et Gayon (25).

Depuis les travaux de Wehmer qui en 1893 découvrit l'acide citrique à côté de l'acide oxalique, dans des cultures de champignons, on sait que beaucoup de moisissures forment de l'acide citrique par oxydation des sucres. Les genres suivants ont été reconnus capables de produire cet acide : *Cytromyces*, *Aspergillus*, *Penicilliums*, *Mucors*, etc. Le pouvoir citrogène d'*Aspergillus niger* est utilisé sur une grande échelle dans la fabrication industrielle de l'acide citrique. Chrzaszcz et Leohnard (14) ont également montré que *Botrytis cinerea* est un organisme producteur d'acide citrique en milieu simple. Ce caractère est certainement une des formes les plus courantes du catabolisme des champignons, parce qu'il est lié aux phénomènes respiratoires, et qu'il est une conséquence de l'universalité du cycle tricarboxylique.

L'équation globale de la formation de l'acide citrique par oxydation des sucres est la suivante :

$$C_6H_{12}O_6 + 3O \rightarrow C_6H_8O_7 + 2\,H_2O$$

Comme dans la fermentation, le premier stade de cette oxydation aboutit, à partir des triosephosphates à l'acide pyruvique. D'après le cycle de Krebs, l'acide citrique provient de la condensation de l'acide pyruvique et de l'acide oxalacétique.

$$\begin{aligned} COOH - CO - CH_2 - COOH + CH_3 - CO - COOH + O \rightarrow \\ COOH - CH_2 - \underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{C}}OH - CH_2\,COOH + CO_2 \end{aligned}$$

L'acide oxalacétique proviendrait lui-même de la carboxylation directe de l'acide pyruvique :

$$CH_3 - CO - COOH + CO_2 \rightarrow COOH - CH_2 - CO - COOH$$

Nous avons étudié, dans de nombreux essais, la formation de l'acide citrique par *Botrytis cinerea* cultivé sur moût de raisin. La figure 4 donne les courbes de la formation d'acide citrique par 6 souches. Les souches étudiées se classent deux par deux. Ici encore les souches N° 3 et 5 produisent

le plus d'acide citrique ; c'est un caractère de ces souches qu'on retrouve dans tous les essais. Le taux maximum qui atteint 60 méq par litre, est obtenu après 40 jours de culture ; par la suite la teneur en acide citrique commence à diminuer, car il est lui-même oxydé. Les souches N° 2 et 6 donnent des quantités moyennes d'acide citrique. Enfin les souches N° 1 et 4 n'en forment pas.

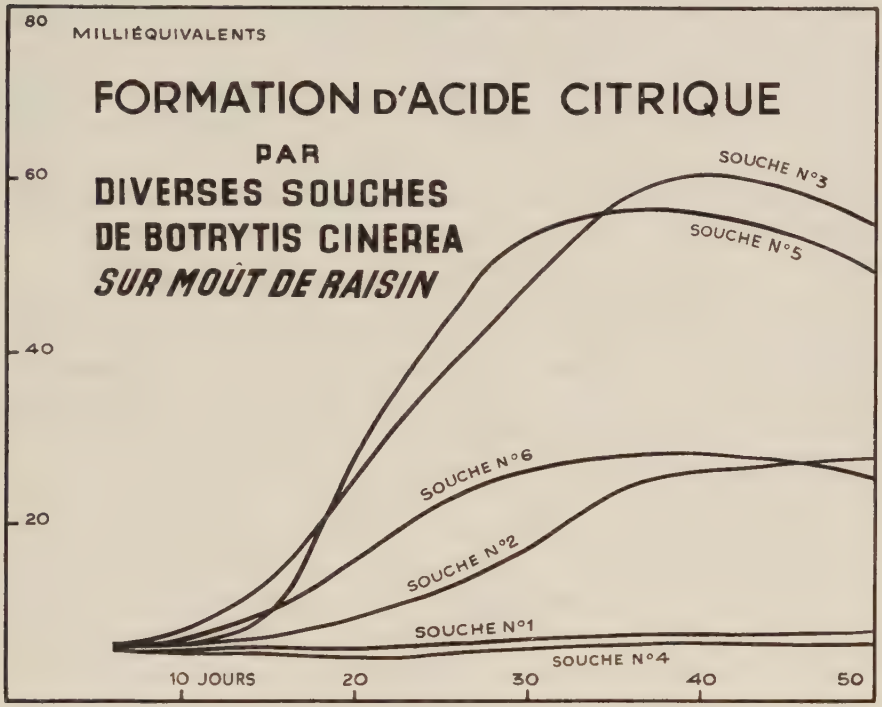


Fig. 4.

Formation d'autres acides

L'acide citrique n'est pas le seul acide formé par le *Botrytis* cultivé sur moût de raisin. Si l'on considère les bilans acidimétriques des jus de culture des tableaux IV et V, on se rend compte qu'il existe le plus souvent des acides organiques qui n'ont pas été dosés, puisque la somme des anions est inférieure à la somme des cations. Mis à part le cas de la souche N° 1, cultivée sur moût de pH 2,98, pour laquelle le bilan acidimétrique est exact, dans tous les autres cas la proportion des acides indosés est importante. Dans une culture très longue ces acides atteignent jusqu'à 103 méq pour une somme globale de cations égale à 147 méq. Ici les deux tiers des acides du moût pourri sont inconnus. La formation de ces acides inconnus est parallèle à celle de l'acide citrique. C'est dans les conditions

et avec les souches qui forment le plus d'acide citrique, qu'on observe dans les bilans les déficits les plus importants.

Nous avons cherché tout d'abord les acides volatils, signalés par les auteurs polonais (14), et qu'on retrouve du reste toujours en quantité plus ou moins abondante dans les moûts de raisins pourris. Le dosage était pratiqué par entraînement à la vapeur et les chiffres trouvés sont reproduits dans le tableau II. Les doses trouvées n'ont jamais dépassé 3 méq par litre. Cette recherche appliquée à un grand nombre de cultures, n'a toujours montré la présence d'acides volatils qu'à l'état de traces.

Ces acides ne constituant pas la fraction indosée, nous avons été conduit à rechercher l'acide gluconique, qui a été souvent signalé dans les milieux de culture de différentes moisissures. Pour cette recherche dans un milieu aussi riche en sucre, nous avons dû mettre au point une nouvelle technique de dosage de cet acide, qui a été décrite dans la première partie.

La découverte de l'acide gluconique dans les cultures d'*Aspergillus niger* est due à Molliard (26) qui observa que les acides citrique et oxalique, toujours présents dans le liquide de culture, ne correspondaient pas quantitativement à l'acidité totale de la solution. L'acide gluconique provient de la simple oxydation en groupement carboxyle, de la fonction aldéhyde du glucose :

$$CH_2OH — (CHOH)_4 — CHO + O \rightarrow CH_2OH — (CHOH)_4 — COOH$$

En 1926, Muller (27) montra que cette oxydation se faisait par l'intermédiaire d'une diastase agissant comme une oxydase. Cette enzyme, qui a donné lieu à un grand nombre d'études récentes, a été appelée glucose-oxydase. Elle est connue encore sous le nom de notatine, antibiotique agissant par libération d'eau oxygénée. L'enzyme est un ferment jaune typique, du groupe des flavoprotéines.

On reconnut plus tard que la formation d'acide gluconique était la propriété d'un grand nombre de champignons et en particulier des *Aspergillus* et des *Penicilliums*. Quelques *Mucors*, *Dematiums* et *Fusariums* ont encore été signalés comme organismes produisant cette réaction. Il est évident que cette propriété est extrêmement répandue parmi les champignons filamenteux et qu'elle dépasse les limites des espèces précitées. *Botrytis cinerea* ne paraît pas avoir été expérimenté à ce sujet.

Nous avons recherché l'acide gluconique dans les moûts ayant servi de culture à *Botrytis cinerea*. Nos résultats ont toujours été positifs et tous les moûts, dès les premiers jours de culture, contiennent cet acide. Cependant nous n'avons pu mettre en évidence que des doses relativement faibles de l'ordre de 3 à 4 méq par litre. Ces faibles formations s'expliquent vraisemblablement par les conditions de pH de nos cultures. Le pH optimum d'activité de la glucose-oxydase est voisin de 6. Au-dessous de pH 3, la

glucose-oxydase est inactive. Nous nous trouvons donc dans les moûts de raisin dans la zone de très faible oxydation du glucose par cette enzyme.

La présence de l'acide gluconique ne peut donc pas résoudre le problème des acides indosés. Toutefois, nous verrons plus loin l'importance de cet acide dans les raisins attaqués par la pourriture noble sur le cep. Son existence dans les vins caractérise avec certitude ceux qui proviennent de raisins pourris.

Par ailleurs la recherche d'autres acides d'origine fongique en particulier de l'acide oxalique, a été négative. Le *Botrytis cinerea* forme dans des cultures prolongées sur moût de raisin des acides organiques que nous n'avons pu identifier.

Influence du pH des milieux de culture sur l'évolution des acides

Les grandes différences observées dans les comportements des cultures sur jus de raisin acide et sur jus de raisin d'acidité faible nous ont conduit à étudier systématiquement les modifications apportées par des variations importantes du pH des moûts de culture. L'augmentation du pH du moût de raisin naturel s'obtenait par addition de soude, la diminution du pH par addition d'acide sulfurique. Pour avoir partout la même concentration des constituants, on ajustait les moûts ainsi modifiés, au même volume avec de l'eau distillée. Le milieu n'était pas tamponné, surtout aux pH élevés ; l'action du *Botrytis* sur les acides a modifié profondément le pH de départ. Cependant, ces différences de concentrations en ions H^+ au début de la culture, ont suffi à influencer profondément le comportement du *Botrytis*.

Au départ la teneur en sucres était de 223 g par litre, et les taux des acides tartrique, malique et citrique, respectivement 51, 45 et 43 méq. Les cultures furent poursuivies à l'étuve à 22° ; elles ont duré 45 jours à dater du jour de l'ensemencement. Après ce délai, le moût était décanté, filtré et soumis à l'analyse.

Dans le tableau VI nous donnons les résultats de ces dosages pour les souches N° 1 et N° 3, qui ont fait preuve des caractères physiologiques les plus différents.

Les souches de *Botrytis* n'ont pu se développer au-dessous de pH 2,3 et jusqu'à pH 2,6 la croissance a été difficile. Au-dessus de cette valeur, les développements sont rapides et les poids de mycélium récoltés sont un peu plus élevés qu'à la neutralité. La quantité de sucre brûlée est maximum pour les deux souches entre pH 3,0 et 4,0 ; cependant les écarts d'un pH à un autre sont faibles et ne dépassent pas 15 à 25 g de sucre.

L'évolution des acides a été beaucoup plus largement influencée par les conditions de pH. La combustion des acides tartrique et malique est d'autant plus importante que le pH de la culture est plus bas. A pH 2,6,

90 p. 100 de ces acides ont été brûlés par la souche N° 1 ; à pH 7,0, à peine 15 p. 100 ont subi le même sort. Il en est de même, quoique d'une manière moins accusée, avec la souche N° 3. Remarquons encore ici qu'à tous les pH la diminution des deux acides a été exactement parallèle. En culture sur milieu homogène il n'y a pas d'action sélective du *Botrytis* vis-à-vis de l'acide tartrique ou de l'acide malique.

TABLEAU VI

Influence du pH sur les transformations du moût de raisin par Botrytis cinerea

pH initial	2,6	3,06	3,47	4,03	4,70	5,81	7,0
Acidité initiale	120	101	87	47	23	6	0
Souche n° 1							
Sucre consommé	93	106	114	95	93	85	88
PH final	2,63	3,93	4,87	5,49	5,67	5,70	5,37
Acidité totale	30	33	22	0	0	0	0
Acide tatririque	6,2	10,3	18,2	25	39	44	45
Acide malique	5	6	7	13	22	27	38
Acide citrique	1,5	3,8	5,7	7,5	15	18	22
Souche n° 3							
Sucre consommé	89	96	98	98	92	83	83
pH final	2,89	3,03	3,27	3,60	3,76	3,80	3,74
Acidité totale	37	36	49	43	44	76	61
Acide tartrique	14	11	15	20	27	30	31
Acide malique	6	6	12	14	27	34	30
Acide citrique	4,2	8,2	39,8	59	68	84	89

La formation de l'acide citrique est sous la dépendance étroite du pH. Comme il est connu pour d'autres moisissures, c'est aux pH élevés que l'acidification est maximum. La souche N° 3 arrive à une formation de 85 méq d'acide citrique, soit 5,5 g par litre. La souche N° 1 toujours moins citrogène, ne donne que 1,4 g. Si l'on considère que précisément cette acidification a fait baisser le pH de départ, il est vraisemblable que les taux d'acide citrique formés auraient été beaucoup plus élevés en milieu tamponné. Par contre en milieu très acide la combustion de cet acide peut l'emporter sur sa formation, et l'acide citrique diminue.

Ces évolutions différentes des acides aux divers pH se sont traduites par des modifications d'acidité de titration d'encore plus d'amplitude. A pH 2,6 l'acidité de titration a baissé de 90 méq pour la souche N° 1, tandis qu'elle n'a pratiquement pas été modifiée à pH 7,0. Pour la souche N° 3, les variations sont encore plus considérables, puisqu'on enregistre une diminution de 83 méq à pH 2,6 et une augmentation de 61 méq à pH 7,0. En somme la physiologie du *Botrytis cinerea* est telle qu'il acidifie les milieux de culture, lorsqu'ils sont neutres, et qu'il les désacidifie, au contraire, lorsqu'ils sont acides.

Formation de glycérol

Laborde a découvert le premier (20) une production constante de glycérol par *Botrytis cinerea*. Son attention avait été attirée par les proportions importantes de glycérol que présentent les vins de Sauternes. Voici exprimés en grammes par litre, les résultats qu'il a obtenus en cultivant le *Botrytis* à l'état pur sur des moûts de raisin stérilisés.

	Moût n° 1		Moût n° 2	
	sucre restant	glycérol	sucre restant	glycérol
	172			
Moût primitif,.....	151	0	300	0
1er dosage.....	122	5,7	217	15,8
2e »	80	7,4	178	11,7
3e »	10	5,2	—	—
4e »		2,3	—	—

On voit que la quantité de glycérol produite dans le moût augmente dans les premiers temps de l'action du *Botrytis*, atteint un maximum et diminue par la suite.

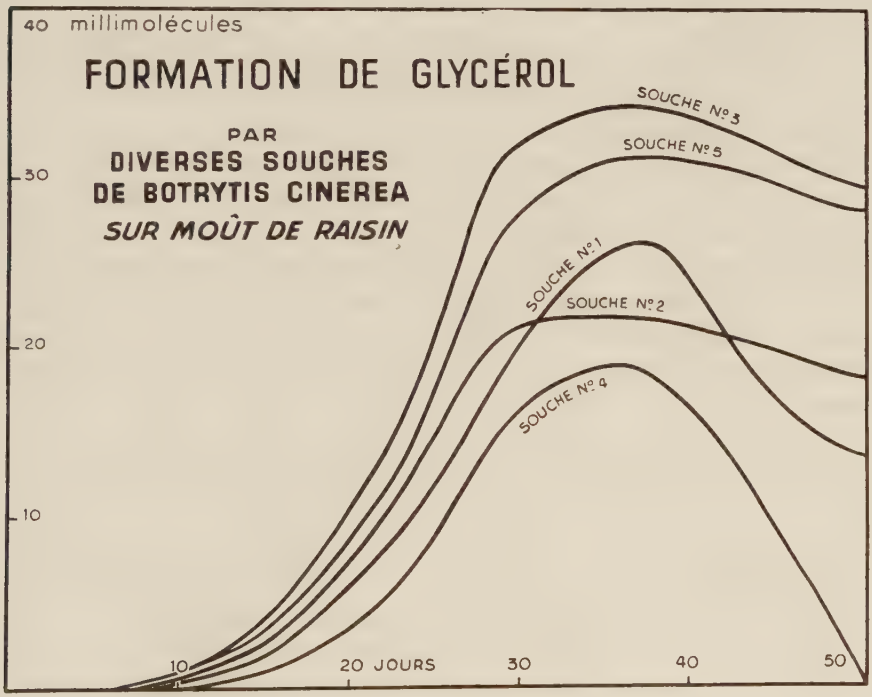


Fig. 5.

Nous avons suivi de la même façon la formation de glycérol par nos diverses souches. La figure 5 a été tracé avec les résultats obtenus sur

moût de raisin de faible acidité et de richesse en sucre élevée. Le tableau VII donne les exemples d'autres essais, effectués sur moût de raisin de pH voisin de 3,0.

Les quantités de glycérol formées dans nos cultures sont un peu inférieures à celles indiquées par LABORDE. Cette récolte plus faible peut tenir à d'autres conditions d'expérimentation ; en particulier le rapport de la surface du mycélium du volume du moût de culture pouvait être différent dans les expériences de LABORDE et dans les nôtres. Les productions les plus fortes que nous ayons enregistrées, atteignent 7 g par litre sur moût acide et 3 g seulement sur moût peu acide. Par ailleurs l'allure du phénoméne est celui indiqué par LABORDE. Les courbes passent par un maximum lorsque 50 à 100 g de sucre ont disparu.

Les souches N° 1 et N° 5 se sont montrées les plus glycérogènes, mais on note des différences de comportement d'une même souche lorsqu'on change de milieu. La courbe de formation de la souche N° 6 qui a été également étudiée se confond avec celle de la souche N° 2 et n'a pas été reportée sur le graphique.

D'un autre côté il n'existe aucune relation apparente entre les propriétés particulières d'une souche de former du glycérol et de former de l'acide citrique.

La production de glycérol avait été observée pour d'autres moisissures, notamment par BIRKINSHAW et ses collaborateurs, pour des *Aspergillus*, des *Helminthosporium* et des *clasterosporium* (28). TAKAHASHI et ASAI (29) ont trouvé avec les *Mucors* des quantités de glycérol pouvant atteindre 9% en poids du sucre décomposé. En ajoutant du sulfite au milieu de culture en milieu neutre, ces auteurs captent de l'éthanal et obtiennent des rendements en glycérol allant jusqu'à 23 p. 100 du sucre (30).On admet donc que le mécanisme de la formation aérobie du glycérol par les moisissures est identique à celui de sa formation au cours de la fermentation anaérobie des sucres. Il y aurait une véritable dégradation glycéropyruvique du sucre :

$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow CH_2OH.CHOH.CH_2OH + CH_3.CO.COOH$$

L'acide pyruvique serait métabolisé alors que le glycérol s'accumule.

TABLEAU VII

Formation de glycérol dans des cultures de Botrytis cinerea *sur moût de raisin*

Teneurs exprimées en millimolécules par litre

Durée de culture	Souche n° 1	Souche n° 2	Souche n° 3	Souche n° 5
13 jours	69,0	36,7	17,0	77,0
18 jours	72,0	40,7	40,5	70,0
38 jours	40,5	46,5	—	—

Influence du pH sur la formation du glycérol

Dans l'essai relatif à l'influence du pH sur l'action du *Botrytis* sur les acides organiques, dont nous avons tiré le tableau III, nous avons également dosé le glycérol formé après 45 jours de culture. Ces dosages nous ont donné les résultats suivants, exprimés en millimolécules par litre :

pH de culture	Souche n° 1	Souche n° 3
2,60	27	52
3,06	23	20
3,47	7	7
4,03	0	3
4,70	0	0
5,81	0	0
7,00	0	0

En fin de culture, on ne trouve de glycérol qu'aux pH les plus bas ; il n'y a pratiquement plus de glycérol au-delà de pH 4,0. Afin de savoir

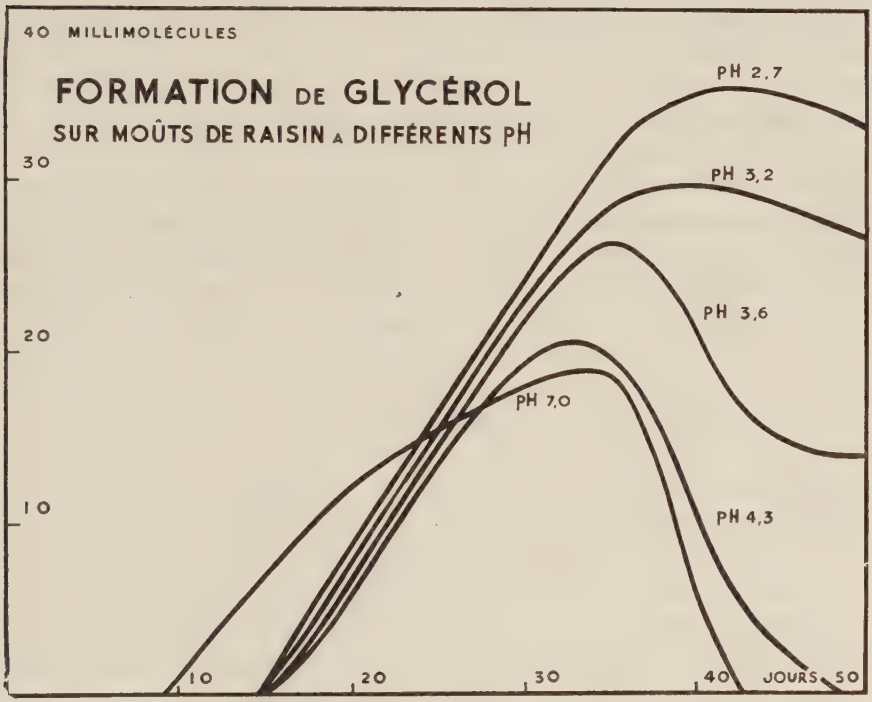


Fig. 6.

si l'absence de ce polyalcool tient à un manque de formation ou à sa disparition en fin de culture, nous avons suivi périodiquement les quantités de glycérol formées par la souche N° 1 cultivée sur moût de raisin de différents pH. La figure 6 reproduit l'allure du phénomène.

Dans les premiers jours de culture les quantités de glycérol formées sont du même ordre. Cependant on note tout au début à pH 7,0 une formation un peu plus élevée. La glycérogenèse paraît peu influencée par le pH de culture ; peut-être cependant un pH élevé la favorise-t-elle. Mais c'est après 25 à 30 jours que les cultures à différents pH se diversifient. Le glycérol diminue d'autant plus vite que le pH est plus élevé. Il tombe rapidement à zéro à pH 7,0 et même à pH 4,3. Par contre, il ne diminue que très peu à pH 2,7. Les courbes de formation passent par un maximum après 30 à 40 jours.

Il ne paraît pas possible d'établir une relation précise entre la formation de glycérol et l'évolution des autres constituants. Alors que les acides tartrique et malique sont brûlés le plus intensément en milieu acide, la combustion du glycérol est maximum en milieu neutre. De la comparaison des figures 4 et 5, il semble qu'on puisse inférer que les souches les plus citrogènes forment aussi le plus de glycérol, mais ce classement n'est pas absolu : certaines souches dans certaines conditions donnent du glycérol et ne donnent pas d'acide citrique. D'autre part, c'est dans les conditions où l'acide citrique est le plus élevé que la production finale de glycérol paraît la plus faible.

Différenciation physiologique des souches de Botrytis cinerea

Au cours des expériences précédemment décrites, nous avons observé que le comportement des souches étudiées diffère sensiblement. Certes, dans les grandes lignes, on reconnaît aux diverses variétés de *Botrytis* les mêmes propriétés d'ensemble, mais elles se différencient dans l'intensité de certaines transformations et notamment dans leur pouvoir de formation du glycérol et surtout de l'acide citrique. Cette dernière propriété caractérise vraiment les souches et nous avons pu classer les six *Botrytis* étudiés en trois groupes, suivant l'importance de l'acidification qu'ils provoquent.

Il semble exister sur les raisins, dans les différentes régions vinicoles de la Gironde, et même dans le cadre d'une seule appellation, une infinité de variétés de *Botrytis*, dont l'action paraît être très différente et parfois même absolument opposée. Une étude sur les bases analytiques qui ont été exposées et une classification de ces variétés s'imposent pour mieux comprendre les résultats de l'évolution de la pourriture du raisin. Il n'est pas douteux que ce soient surtout les conditions atmosphériques qui font le départ entre la pourriture noble et la pourriture grise, avec du reste tous les intermédiaires que ces deux états peuvent comporter. Mais vraisemblablement les *Botrytis* qui se développent à Sauternes et produisent des raisins « rôtis », appartiennent à des variétés différentes de celles qui envahissent le Médoc ou détériorent les raisins du Blayais.

***

La technique des cultures pures nous a donc permis de saisir et de chiffrer plusieurs aspects de la physiologie du *Botrytis cinerea* se développant à la surface du moût de raisin. En particulier la combustion des sucres et des acides tartrique et malique a été mise en évidence ; d'autre part, les formations de glycérol, d'acide citrique et d'acide gluconique ont été observées.

Ces phénomènes vont nous permettre de comprendre les transformations profondes de la composition du raisin que provoque la pourriture noble.

III. — Etude de la surmaturation du raisin par la pourriture noble

Cette étude a été commencée aux vendanges de 1950, par des analyses comparatives de grains de raisins mûrs, mais parfaitement sains, et de grains pourris arrivés au stade « rôti ». On a opéré sur les raisins de trois vignobles ; les cépages auxquels ils appartenaient étaient ceux qui constituent la base de l'encépagement du Bordelais : le Sémillon et le Sauvignon. Les baies saines et les baies pourries étaient prélevées sur les mêmes grappes. Par simplification, on n'a pas différencié les cépages. Les moûts obtenus correspondaient donc à un mélange de Sémillon et de Sauvignon.

En 1951, nous avons suivi le développement de la pourriture noble au vignoble. A différentes époques et dès qu'apparurent les premiers raisins pourris, des analyses détaillées et des bilans acidimétriques ont été établis sur les moûts de raisins pourris et de raisins sains cueillis le même jour. Ces analyses comparatives ont été répétées tous les 10 jours.

Technique d'échantillonnage

Les prélèvements de raisins avaient lieu dans les régions productrices des grands vins blancs liquoreux, à Sauternes et à Barsac sur la rive gauche de la Garonne, et à Loupiac et Saint-Macaire sur la rive droite. De plus, en 1950, nous avons analysé des raisins provenant d'un vignoble de Graves, à Léognan, qui donne avec les mêmes cépages, des vins secs.

Dans les analyses de raisins, matériel toujours fortement hétérogène, la question de l'échantillonnage est un point particulièrement délicat. De la façon dont on effectue l'échantillon moyen, dépendent en effet, pour une grande part, les résultats de l'analyse et la valeur des conclusions qu'on peut en tirer. Tous les dix jours environ, toujours aux mêmes heures de la journée, plusieurs kilos de raisins étaient ramassés dans les vignobles d'expérience. On opérait toujours sur les mêmes rangées de ceps, en répartissant la cueillette sur environ 250 pieds. On prélevait par fragments de grappe, en choisissant autant que possible une partie

de raisins sains et une partie de raisins pourris. Au laboratoire, ces raisins étaient à nouveau triés grain par grain et séparés en deux lots : l'un de raisins mûrs, mais ne présentant pas d'attaque de *Botrytis*, l'autre de raisins pourris correspondant à ce qu'on appelle les grains « rôtis ». Nos échantillons ne représentaient donc pas l'état moyen actuel des raisins du vignoble. Nos analyses reflètent plutôt l'évolution de la composition des grains les plus pourris et les plus sains et expriment des différences dues à l'action du *Botrytis* par rapport à des raisins aussi avancés au point de vue maturité naturelle, mais non pourris.

Après ce triage, les grains des deux catégories sont comptés, pesés, écrasés et leur jus est exprimé modérément à l'aide d'une presse à main. Pour obtenir un meilleur épuisement, on lave les raisins avec un volume d'eau tiède correspondant à 10 p. 100 environ du jus exprimé. Dans les analyses on tient compte de la dilution qui est intervenue. On note les volumes de jus obtenus lors de la pressée de chaque lot.

Les moûts sont alors pasteurisés à 80° en bouteilles bouchées de liège et conservés en flacons bouchés jusqu'au moment des analyses. Celles-ci étaient terminées après 3 mois de conservation.

Résultats analytiques

Les documents analytiques obtenus font l'objet de 6 tableaux différents.

Le tableau VIII présente les bilans acidimétriques des moûts de la récolte de 1950. Nous y avons exprimé les bilans des transformations dues au *Botrytis*, en calculant les différences de composition des grains sains et pourris. Bien qu'en réalité, ces analyses ne s'appliquent pas exactement aux mêmes baies envisagées avant et après l'action de la pourriture, ces bilans des transformations sont valables et mettent en relief des différences intéressantes.

Dans le tableau IX, à partir des mêmes chiffres, on a calculé les teneurs en milliéquivalents pour 1000 grains de raisin. Ce tableau représente l'action du *Botrytis* sur les constituants chimiques du grain de raisin indépendamment des modifications de volume et de la perte d'eau.

Les tableaux X et XII donnent, respectivement pour les crus de la rive gauche et de la rive droite de la Garonne, l'évolution de la composition des raisins sains et pourris dans les semaines précédant la cueillette. Les résultats des analyses sont exprimés sous forme de bilans acidimétriques. On a dosé également les sucres et le glycérol. Précisons qu'à notre connaissance, il n'avait pas encore été publié de bilans acidimétriques ou des transformations de jus de raisins botrytisés.

Les tableaux XI et XIII expriment ces mêmes résultats calculés pour 1 000 grains de raisin et représentent le phénomène physiologique.

Tableau VIII

Influence de la pourriture noble sur la composition du moût de la récolte 1950

Milliéquivalents par litre de moût

État des raisins	Sucre g	pH	Acidité	Alcalinité des cendres	NH_4	Somme des cations	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique	Acide acétique	Acide phosphorique	Somme des anions
						Barsac						
Sains	238	3,35	80	33	4,8	*118*	69	30	3,6	4,0	4,7	*111*
Pourris	431	3,28	84	70	2,0	*156*	42	75	8,0	19,0	8,0	*152*
Variations			+ *4*	+ *37*	— *2,8*	+ *38*	— *27*	+ *45*	+ *4,4*	+ *15,0*	+ *3,3*	+ *41*
						Sauternes						
Sains	248	3,65	55	25	2,3	*82*	47	25	2,9	3,6	4,2	*83*
Pourris	457	3,60	107	66	1,8	*175*	57	73	9,8	11,8	9,7	*161*
Variations			+ *52*	+ *41*	+ *0,5*	+ *93*	+ *10*	+ *48*	+ *6,9*	+ *8,2*	+ *5,5*	+ *78*
						Léognan						
Sains	222	3,20	84	28	3,1	*115*	80	34	3,9	2,0	2,5	*122*
Pourris	296	3,31	101	44	2,1	*147*	53	59	9,8	7,9	4,3	*134*
Variations			+ *17*	+ *16*	— *1,0*	+ *32*	— *27*	+ *25*	+ *5,9*	+ *5,9*	+ *1,8*	+ *12*

Tableau IX

Influence du Botrytis cinerea sur la composition de la baie de raisin récolte 1950

Milliéquivalents pour 1 000 baies de raisins

Etat des raisins	Poids de 100 baies	Jus de 100 baies	Sucre	100 G/L	Acidité	Alcalinité des cendres	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique	Acide acétique	Acide phosphorique
					Barsac						
Sains	75 g	58 cm³	139 g	80	46	19	42	17	2,1	2,3	2,7
Pourris	66	28	124	67	24	20	14	21	2,4	5,6	2,3
					Sauternes						
Sains	209	127	316	85	70	31	60	32	3,7	4,3	5,4
Pourris	101	48	220	80	51	32	27	35	4,7	5,3	4,7
					Leognan						
Sains	163	108	240	102	91	30	87	37	4,3	2,2	2,7
Pourris	94	47	140	70	48	21	25	27	4,6	3,7	2,0

Tableau X

Influence de la pourriture noble sur la composition du moût; récolte 1951 (Rive gauche de la Garonne)

Milliéquivalents par litre de moût

Dates	État des raisins	Sucres g	pH	Acidité	Alcalinité des cendres	NH_4	*Somme des cations*	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique	Acide glucono-nique	Acide acétique	Acide phospho-rique	*Somme des anions*	Glycérol mmol
							BARSAC								
25/IX	Sains	161	3,12	140	32	6,0	*178*	70	89	2,8	—	2,3	3,3	*168*	
	Pourris	195	3,21	122	43	2,2	*167*	52	99	4,2	1,4	6,1	3,0	*165*	14
5/X	Sains	169	3,18	127	33	4,7	*165*	72	75	3,1	—	2,0	3,0	*155*	
	Pourris	210	3,30	108	47	3,3	*158*	43	86	5,4	2,3	7,7	3,7	*148*	24
15/X	Sains	226	3,27	126	38	5,2	*169*	68	87	2,3	—	3,6	3,0	*164*	
	Pourris	284	3,40	116	59	1,3	*176*	45	114	3,5	4,7	7,0	6,0	*180*	26
24/X	Sains	247	3,33	123	33	4,7	*161*	71	81	2,7	—	3,5	3,9	*162*	
	Pourris	317	3,62	112	81	0,7	*194*	33	117	3,5	10,6	5,4	6,9	*176*	31
							SAUTERNES								
25/IX	Sains	203	3,06	188	47	2,9	*238*	87	139	2,4	—	3,0	4,0	*235*	
	Pourris	250	3,22	169	69	0,8	*240*	59	154	2,7	3,0	8,7	4,9	*232*	7
5/X	Sains	224	3,14	170	47	2,2	*219*	68	123	2,7	—	1,7	4,5	*200*	
	Pourris	295	3,26	141	75	0	*216*	56	138	5,2	3,0	11,0	4,7	*218*	18
15/X	Sains	206	3,21	115	39	1,8	*156*	69	74	2,4	—	1,5	3,6	*150*	
	Pourris	284	3,39	100	65	0,6	*166*	39	100	4,5	6,5	3,7	3,7	*157*	28
24/X	Sains	281	3,39	109	44	1,4	*154*	69	73	3,0	—	2,0	3,5	*150*	
	Pourris	326	3,51	108	100	0,2	*208*	25	111	5,0	5,9	4,7	4,5	*156*	22

Tableau XI

Influence du Botrytis cinerea sur la composition de la baie de raisin ; récolte 1951 (Rive gauche de la Garonne)

Milliéquivalents pour 1000 baies de raisin

Dates	État des raisins	Poids de 100 baies g	Jus de 100 baies cm³	Sucres g	100 G / L	Acidité	Alcalinité des cendres	NH_4	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique	Acide gluconique	Acide acétique	Acide phosphorique
						BARSAC								
25/IX	Sains	176	132	185	101	161	36	6,9	81	102	3,3	—	2,3	3,3
	Pourris	132	81	158	92	103	35	1,8	42	80	3,4	1,1	6,1	3,0
5/X	Sains	184	120	203	99	142	38	5,6	86	90	3,4	—	2,4	3,6
	Pourris	145	81	170	88	88	38	2,7	35	70	4,4	1,9	6,2	3,0
15/X	Sains	191	105	237	95	132	40	5,5	71	92	2,4	—	3,8	3,5
	Pourris	132	57	162	83	66	34	0,7	26	65	2,0	2,7	4,0	2,7
24/X	Sains	202	100	247	92	123	33	4,7	71	81	2,7	—	3,5	3,9
	Pourris	98	45	159	83	50	37	0,3	15	54	1,6	4,8	2,4	3,0
						SAUTERNES								
25/IX	Sains	215	115	233	107	216	54	3,4	100	160	2,7	—	3,5	4,4
	Pourris	124	81	165	93	137	56	0,5	48	125	2,4	2,4	5,7	3,3
5/X	Sains	260	120	319	105	206	56	2,6	94	148	3,8	—	2,3	7,1
	Pourris	146	81	241	90	114	62	0	45	112	4,1	2,4	9,0	3,8
15/X	Sains	280	155	319	98	178	60	2,8	107	115	3,7	—	2,3	5,5
	Pourris	140	80	227	80	80	52	0,5	31	80	3,6	5,2	3,0	3,0
24/X	Sains	285	145	367	96	158	64	2,0	100	105	4,3	—	2,9	5,1
	Pourris	112	62	203	75	67	62	0,1	15	69	3,1	3,7	2,8	2,8

Tableau XII

Influence de la pourriture noble sur la composition du moût ; récolte 1951 (Rive droite de la Garonne)

Milliéquivalents par litre de moût

Dates	État des raisins	Sucres g	pH	Acidité	Alcalinité des cendres	NH_4	*Somme des cations*	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique	Acide glucono-nique	Acide acétique	Acide phospho-rique	*Somme des anions*	Glycérol mmol
							LOUPIAC								
25/IX	Sains	191	3,15	94	45	4,8	*144*	76	51	3,5	—	2,0	4,3	*137*	
	Pourris	248	3,46	81	87	0,5	*169*	60	86	6,1	2,2	12,0	5,2	*171*	24
5/X	Sains	220	3,16	104	47	2,0	*153*	84	53	3,2	—	2,3	3,5	*146*	
	Pourris	325	3,50	91	96	0,5	*188*	74	82	5,7	2,8	8,5	5,5	*178*	17
15/X	Sains	244	3,20	98	46	1,6	*146*	76	56	2,7	—	1,2	4,8	*141*	
	Pourris	282	3,53	78	78	0,2	*156*	64	63	5,0	4,7	8,3	5,0	*150*	23
24/X	Sains	242	3,37	78	44	1,5	*124*	76	41	2,7	—	1,5	4,7	*126*	
	Pourris	320	3,62	71	94	0	*165*	61	77	4,8	5,6	3,9	5,0	*157*	21
							SAINT-MACAIRE								
25/IX	Sains	199	2,98	127	38	5,3	*170*	66	91	3,8	—	1,0	4,3	*166*	
	Pourris	240	3,03	162	57	3,0	*222*	74	130	5,1	2,1	3,6	5,1	*220*	12
5/X	Sains	222	3,15	134	43	4,4	*181*	77	86	2,5	—	3	5,5	*174*	
	Pourris	303	3,30	163	70	2,2	*235*	70	118	5,7	2,8	12	2,7	*211*	15
15/X	Sains	229	3,20	107	37	4,4	*148*	65	71	2,8	—	1,5	5,1	*145*	
	Pourris	282	3,32	109	62	1,8	*173*	54	95	4,2	6,8	5,3	4,0	*169*	19
24/X	Sains	228	3,31	105	37	4,0	*146*	63	67	3,1	—	2,0	5,0	*140*	
	Pourris	280	3,42	95	50	0,4	*145*	45	84	3,8	5,9	6,1	4,6	*149*	19

Tableau XIII

Influence du Botrytis cinerea sur la composition de la baie de raisin ; récolte 1951 (Rive droite de la Garonne)

Milliéquivalents pour 1000 baies de raisin

Dates	État des raisins	Poids de 100 baies g	Jus de 100 baies cm³	Sucres g	100 G / L	Acidité	Alcalinité des cendres	NH_4	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique	Acide glucono-nique	Acide acétique	Acide phospho-rique
							LOUPIAC							
25/IX	Sains	253	131	250	93	123	56	2,3	99	87	4,6	—	2,6	5,6
	Pourris	92	62	173	88	50	54	0,3	37	53	3,8	1,3	7,4	3,2
5/X	Sains	215	120	264	92	125	56	2,4	100	76	3,8	—	2,7	3,5
	Pourris	100	61	198	87	56	58	0,3	44	50	3,5	1,5	5,2	3,3
15/X	Sains	280	125	305	92	123	57	2,0	98	70	3,6	—	1,5	6,0
	Pourris	116	66	199	85	48	51	0,1	42	42	3,3	3,1	7,2	3,4
24/X	Sains	273	130	313	90	100	57	1,9	99	53	3,7	—	1,8	6,0
	Pourris	100	62	198	85	44	58	0	38	48	3,0	3,5	2,4	3,0
							SAINT-MACAIRE							
25/IX	Sains	200	110	220	97	141	42	5,8	72	100	4,2	—	1,1	5,9
	Pourris	126	66	161	90	107	38	2,0	49	86	3,4	1,4	4,3	3,0
5/X	Sains	205	103	229	90	138	44	4,5	79	89	2,6	—	3,1	5,7
	Pourris	130	60	182	81	98	42	1,3	42	80	3,4	1,7	7,2	1,6
15/X	Sains	215	118	260	90	125	44	5,3	77	84	3,3	-	1,8	6,0
	Pourris	135	80	225	82	87	49	1,6	43	76	3,4	5,4	4,2	3,2
24/X	Sains	220	120	273	88	127	44	4,8	76	80	3,7	—	2,4	6,0
	Pourris	140	86	245	83	82	43	0,3	39	72	3,3	4,6	5,2	3,8

En somme, les résultats de chaque analyse ont été exprimés de deux façons différentes : 1° par rapport à un certain nombre de grains de raisin ; on dégage ainsi l'effet physiologique du *Botrytis* sur les constituants chimiques du grain ; 2° en valeurs rapportées au litre de moût ; ces chiffres représentent le résultat global du développement de la pourriture noble. La composition des moûts est conditionnée à la fois par l'action propre du *Botrytis* et par les actions physiques qui l'accompagnent, en particulier la concentration par évaporation d'eau. Dans notre exposé nous séparerons ces deux phénomènes qui seront étudiés successivement.

A. Action du *Botrytis cinerea* sur les constituants du grain de raisin

Dans les grandes lignes, ces transformations sont celles que nous avons observées lors des cultures pures sur moût de raisin, mais dans les détails apparaissent des différences importantes. Les conditions du développement du parasite in vitro et sur le grain de raisin ne sont pas absolument comparables. On notera que nos expériences durèrent plus d'un mois, alors qu'au vignoble l'action du *Botrytis* est rarement aussi prolongée. Par contre, pour le raisin la surface offerte au champignon est particulièrement importante en regard du volume du grain ; on peut calculer que pour un même volume de jus, le *Botrytis* occupe une surface 3 fois plus importante dans le cas du grain de raisin que dans le cas de nos cultures. Il faut considérer encore que le raisin est un milieu cellulaire, donc très hétérogène. Toutes les cellules ne sont certainement pas attaquées et toutes ne sont pas attaquées en même temps par le *Botrytis*. C'est vraisemblablement le contenu des vacuoles des cellules de la périphérie, qui est le plus modifié. Le *Botrytis* pénètre ses filaments dans le raisin en profondeur, mais la masse mycélienne reste faible et la végétation aérienne restreinte. Enfin, nous avons déjà souligné au début de ce chapitre, la discontinuité du développement du *Botrytis* dans la nature, due à l'alternance dans une même journée de conditions favorables et défavorables. On conçoit donc que les modifications observées au paragraphe précédent dans la composition des moûts ayant servi de culture ne peuvent être exactement reproduites dans une étude in vivo.

Nous étudierons successivement l'action du *Botrytis* sur les sucres et sur les acides du raisin, et la formation d'acide citrique, d'acide acétique, d'acide gluconique et de glycérol.

Action de la pourriture noble sur les sucres. — Les sucres ont été brûlés par le *Botrytis* d'une manière très importante. On trouve toujours nettement moins de sucres, en valeur absolue, dans les grains pourris que dans les grains sains. Au cours des quatre prélèvements effectués, le taux de sucre ne cesse d'augmenter de 10 jours en 10 jours dans les raisins sains.

La maturation en 1951 a été très tardive, mais l'accumulation du sucre dans le raisin s'est poursuivie jusqu'à la fin octobre.

Il n'en est pas ainsi pour les raisins pourris, pour lesquels la teneur en sucre passe par un maximum, généralement au début d'octobre, puis décroît au fur et à mesure que le *Botrytis* se développe.

Remarquons tout d'abord que la pourriture n'a pas évolué partout de la même façon. Très active surtout à Loupiac, puis à Sauternes et Barsac, elle est, dans le même temps, beaucoup plus faible et de développement plus lent à Saint-Macaire. Il est certain que la pourriture noble trouve dans certains microclimats des conditions plus favorables.

Dans le tableau XIV, nous avons rassemblé à côté du facteur de concentration calculé d'après la perte de poids du grain de raisin, les pourcentages de combustion des sucres et des différents acides. Il est bien entendu que ces valeurs ne représentent pas le phénomène moyen ayant influé sur la composition de la récolte, puisque les analyses ont porté sur les raisins triés les plus pourris, mais qu'elles représentent l'action limite du *Botrytis*. La proportion de sucre brûlé n'a cessé d'augmenter, du 25 septembre au 24 octobre. Dans les régions de pourriture noble typique, elle atteint 35 à 44 p. 100. Peut-être ; ces différences ne sont pas simplement le fait d'une combustion. Il n'est pas impossible que la migration des sucres soit interrompue beaucoup plus tôt vers les raisins mortifiés par le parasite. Quoi qu'il en soit, la pourriture noble occasionne une perte considérable de sucre de la récolte sur pied. En vendangeant des raisins sains, le producteur récolterait en supplément, sur la totalité de son vignoble, plus de la moitié du tonnage de sucres qu'apportent les raisins pourris rôtis, répartis sur un volume double de vin. Ce n'est donc qu'au prix de pertes importantes de quantité, que le producteur obtient, par la concentration naturelle, des vins plus riches et de plus grande qualité.

Dans tous les cas où il a été déterminé, le rapport glucose/lévulose a diminué durant le développement de la pourriture. Dans les raisins, comme cela avait été observé sur les moûts, le glucose est davantage attaqué que le lévulose.

Action de la pourriture noble sur les acides. — La pourriture s'est toujours traduite par une forte diminution de l'acidité du grain de raisin. Le tableau XIV exprime cette diminution dans la colonne « pourcentage de combustion de l'acidité ». On observe que ce pourcentage augmente continuellement durant la surmaturation. Parfois jusqu'aux deux tiers des acides du raisin disparaissent. Parallèlement le pH augmente de 0,1 à 0,2 par rapport à celui du jus de raisins sains.

Par ailleurs, on remarque que la combustion des acides est proportionnellement toujours beaucoup plus élevée que la combustion des sucres. Le *Botrytis* exerce une action vraiments élective sur les acides du raisin. La perte d'acidité représente parfois presque le double de la consommation

des sucres. C'est une relation qu'il convient de souligner, car il est très avantageux au point de vue de la qualité, que l'acidité du raisin soit abaissée plus que sa richesse en sucre.

D'après les résultats des tableaux XI et XIII, il est clair que les acides tartrique et malique sont tous deux brûlés par le *Botrytis*. Tandis que le taux d'acide tartrique des grains sains n'a pas varié dans le mois précédant les vendanges, il est très inférieur dans les raisins pourris, où il n'a pas cessé de décroître. A Sauternes, il y a 6 fois moins d'acide tartrique dans les raisins pourris que dans les raisins sains ; les rapports sont plus faibles à Loupiac et à Saint-Macaire.

Les pourcentages de combustion des acides tartrique et malique ont été du reste comparés dans le tableau XIV. La diminution de l'acide malique a toujours été 2 à 3 fois plus faible que celle de l'acide tartrique. Dans deux cas même en 1950, les raisins pourris avaient un peu plus d'acide malique que les raisins sains.

Ces résultats sont en opposition avec ceux que nous avaient donné les cultures sur moût où les deux acides étaient identiquement attaqués. Peut-être pourrait-on voir l'explication de ces différences de comportement dans le fait qu'acide malique et acide tartrique ne se trouvent pas répartis de la même façon dans le grain de raisin. En accord avec certaines observations, il semble que l'acide tartrique est plus abondant dans les cellules de la périphérie et qu'au contraire l'acide malique se trouve surtout dans l'intérieur du grain. L'acide tartrique serait ainsi plus accessible à l'action du *Botrytis* que l'acide malique.

Quoi qu'il en soit, et sans négliger cette diminution de l'acide malique, on peut dire que le résultat pratique de l'action du *Botrytis* par rapport au phénomène de la maturation normale se traduit par un abaissement de l'acidité du grain, en diminuant surtout l'acide tartrique.

Formation d'acides par la pourriture noble. — On n'a jamais constaté dans les raisins pourris, une augmentation de la teneur en acide citrique. Les variations qu'indiquent les tableaux IX, XI et XIII, et qui vont aussi bien dans un sens que dans l'autre, sont faibles et restent de l'ordre des erreurs des mesures. Ces résultats ne confirment pas exactement ceux obtenus dans les cultures pures. Il faut donc penser, ou bien que les variétés de *Botrytis cinerea* qui se sont développées dans les différents vignobles étudiés, ont des pouvoirs citrogènes nuls, ou bien encore que les conditions de développement in vivo ne reproduisent pas celles qui sont nécessaires à l'apparition de l'acide citrique.

De même, la divergence est nette en ce qui concerne l'acide acétique. Nous n'avions observé dans les cultures du *Botrytis* que de très faibles formations de cet acide, mais dans les raisins pourris elles sont beaucoup plus importantes. Elles correspondent, à cause également de la concentration que nous étudierons plus loin, à des teneurs en acidité volatile qui ne

sont jamais négligeables et qui peuvent atteindre exceptionnellement 19 méq par litre. Certaines années il arrive que ces chiffres soient dépassés.

TABLEAU XIV

Transformation du grain de raisin par la pourriture noble

Dates des prélèvements	Coefficient de concentration	Pourcentages de combustion			
		des sucres	de l'acidité	de l'acide tartrique	de l'acide malique
		Barsac 1950			
	1,14	11	48	66	—
		Sauternes 1950			
	2,06	30	27	55	—
		Léognan 1950			
	1,72	42	47	71	27
		Barsac 1951			
25/IX	1,32	9	36	48	22
5/X	1,26	16	38	59	22
15/X	1,45	32	50	63	29
24/X	2,06	35	59	79	33
		Sauternes 1951			
25/IX	1,72	29	36	52	22
5/X	1,78	25	44	52	24
15/X	2,00	29	55	71	30
24/X	2,55	44	58	85	34
		Loupiac 1951			
25/IX	2,75	30	59	52	39
5/X	2,15	25	55	56	34
15/X	2,42	35	61	56	40
24/X	2,73	37	66	61	10
		Saint-Macaire 1951			
25/IX	1,60	27	24	32	14
5/X	1,58	21	29	47	10
15/X	1,60	14	30	44	10
24/X	1,58	10	35	49	10

On a retrouvé dans tous les raisins pourris la présence d'acide gluconique, alors que les raisins sains n'en contiennent que des traces correspondant à la limite de sensibilité de la méthode de dosage. Les teneurs en acide gluconique augmentent progressivement de 10 jours en 10 jours et il s'en forme jusqu'à 5 méq pour 1 000 grains de raisin. Ramenées au litre de moût, les teneurs varient de 5,6 à 10 méq, soit grossièrement de 1 à 2 g. La présence d'acide gluconique dans un moût, et dans un vin de cet acide infermentescible, est une preuve de l'intervention de la pourriture, et les taux d'acide gluconique sont d'autant plus élevés que l'attaque des raisins par le *Botrytis* a été plus poussée.

Formation de glycérol par la pourriture noble. — Dans tous les raisins pourris, on relève la formation du glycérol (tableaux X et XII). Les

teneurs augmentent, avec quelques irrégularités, durant la surmaturation. Au moment de la dernière trie, à la fin octobre, on trouve de 20 à 30 mmol de glycérol par litre de moût, soit environ 2 à 3 g. Ces proportions sont nettement plus faibles que celles des documents de Laborde. Mais l'automne 1951 n'a pas été particulièrement favorable à la maturation du raisin et au développement de la pourriture noble. Les richesses en sucre n'ont pas dépassé 18°Baumé et les teneurs en glycérol indiquées ici doivent vraisemblablement être dépassées dans des moûts plus riches d'une année de grande maturation.

B. Phénomène physique de concentration par évaporation d'eau

L'attaque du grain de raisin par le *Botrytis* ne se borne pas aux importantes transformations physiologiques qui viennent d'être étudiées. Le raisin attaqué est devenu un organe mort. La pellicule est percée par les filaments mycéliens, les parois cellulaires sont dissoutes par la pectase et la cytase du champignon parasite. L'organisation du grain de raisin est rompue et la migration et les échanges avec la plante sont stoppés. Le tissu végétal, ainsi désorganisé, est dès lors soumis aux influences extérieures. En période sèche et chaude, il perd rapidement de l'eau et se concentre ; la richesse en sucre de son moût s'accroît considérablement. En période pluvieuse ou humide, au contraire, il absorbe de l'eau comme une éponge et le degré diminue rapidement. Les fluctuations journalières de la teneur en sucres du jus d'expression des raisins sont, de ce fait, très importantes. L'humidité des brouillards matinaux, fréquents à cette époque de l'année dans la vallée de la Garonne, suffit à abaisser les degrés. Les vendanges doivent se poursuivre par beau temps. Au cours d'une journée ensoleillée, on voit les degrés augmenter parfois de plusieurs unités et les « charges » de raisins de l'après-midi donnent les moûts les plus riches.

Nous avons exprimé dans le tableau XIV, le coefficient de concentration calculé d'après la perte de poids du grain de raisin. C'est le rapport du poids de 100 grains pourris à celui de 100 grains sains. D'après les considérations précédentes, ce coefficient est donc très variable ; pour les mêmes conditions de cueillette, il a varié de 1,58 à 2,73. Généralement il ne cesse d'augmenter avec la surmaturation et c'est ce qu'on observe à Barsac et à Sauternes. Mais il s'est maintenu à Loupiac et à Saint-Macaire, où la concentration maximum était déjà acquise le 25 septembre. Ce coefficient est assez bien en relation avec la richesse saccharine des moûts, que donnent les tableaux VIII, X, et XII.

Les acides sont de même concentrés, comme tous les constituants du moût, et si finalement l'acidité du raisin n'augmente pas en rapport avec les sucres, on le doit au fait que les acides sont proportionnellement plus brûlés par le *Botrytis* que les sucres. Généralement l'acidité du moût

de raisins pourris est un peu plus faible que celle du moût sain, mais les tableaux donnent de nombreux exemples pour lesquels ces deux acidités sont du même ordre ou même pour lesquels l'acidité du moût pourri est la plus forte. Ces modifications dépendent de beaucoup de facteurs. Si le *Botrytis* intervient sur des raisins très mûrs, déjà peu acides, qui seront par la suite fortement concentrés dans une période de temps favorable, le moût final pourra être plus acide que celui qui aurait été obtenu avec des raisins non pourris. Au contraire, une pourriture précoce de raisins encore insuffisamment mûrs, donc acides, comme ce fut le cas en 1951, peut se traduire par une forte diminution de l'acidité du moût, diminution qui prend le pas sur la concentration.

Même quand le moût pourri a une acidité de titration plus forte, son pH est plus élevé que celui du moût sain. C'est en effet l'acide tartrique, qui conditionne pour une grande part la concentration en ions H^+, parce qu'il est l'acide organique le plus fort du vin, qui est le plus attaqué par la pourriture.

En somme, ce qui différencie au point de vue acidimétrique le moût de raisins pourris du moût de raisins sains, c'est que le premier contient proportionnellement davantage d'acides faibles que le second et que le taux de salification de ces acides est beaucoup plus élevé. Le nouvel équilibre physico-chimique qui en résulte contribue certainement à donner pour une large part, leurs caractères spéciaux aux vins vinifiés avec le concours de la pourriture noble.

IV. — Composition des grands vins liquoreux

En conclusion de ce chapitre, nous donnons des exemples de la composition analytique détaillée de vins liquoreux obtenus avec le concours de la pourriture noble du raisin. Le tableau XV rassemble des données pour des vins de qualité exceptionnelle. Les analyses des vins de Barsac ont été effectuées sur les lots récoltés successivement dans un même vignoble, au fur et à mesure des tries. D'un lot à un autre ; les différences de composition peuvent être considérables. On observe en 1949 ; au cours d'une période de temps très favorable, l'évolution progressive de la pourriture noble qui se traduit par une augmentation constante de la richesse du vin en alcool, en sucre et aussi en acidité, des premières aux dernières tries. En 1950 l'évolution est plus irrégulière. Les analyses des vins de Sauternes du bas du tableau correspondent à l'ensemble des récoltes de différents millésimes d'un même cru.

Tous ces vins se caractérisent par leur grande richesse de composition et on peut dire que ce sont de véritables vins concentrés. Leur composition est marquée davantage par le phénomène physique de concentration du raisin que par l'action physiologique propre du *Botrytis cinerea*. Leur

Tableau XV

Composition acidimétrique de vins blancs liquoreux

	Alcool	Degré Baumé	Richesse totale	Glycérol mmol	pH	Acidité de titration	Alcalinité des cendres	Acide tartrique	Acide malique	Acide citrique	Acide gluconique	Acide acétique	Acide lactique	Acide succinique	Acide phosphorique
								CHATEAU D., BARSAC 1949							
1	15°2	0°4	15°6	160	3,62	85	24	17,5	35	7,4	—	12,2	10,7	18,6	5,2
2	14°8	0°3	15°1	127	3,59	76	32	19,8	43	4,5	—	9,2	8,0	14,3	3,2
3	16°6	0°3	16°9	142	3,55	81	34	16,4	39	8,8	—	14,7	10,0	15,8	3,4
4	11°0	9°6	20°6	155	3,60	95	61	23,8	62	12,0	—	23,2	5,0	15,2	4,0
5	11°8	8°6	20°4	145	3,58	102	35	19,8	46	9,9	—	19,0	8,0	17,8	5,0
6	12°2	8°1	20°3	139	3,59	109	40	22,1	60	11,4	—	27,0	3,6	19,6	5,5
								CHATEAU C., BARSAC 1950							
1	15°1	2°2	17°3	157	3,72	94	33	11,4	46	10,7	3,0	16,2	9,0	—	4,3
2	13°2	2°0	15°2	129	3,52	81	30	16,2	35	7,6	3,0	13,7	8,0	—	3,5
3	14°2	7°2	21°4	148	3,76	76	41	11,0	36	8,9	3,4	25,2	9,0	—	4,0
4	14°6	2°4	17°0	145	3,54	79	36	19,3	42	9,3	4,6	15,4	10,0	—	3,2
5	14°0	6°4	20°4	153	3,80	83	44	18,4	48	9,1	1,3	22,2	10,0	—	4,3
6	13°2	5°7	18°9	120	3,35	72	28	15,4	37	7,3	1,0	14,0	6,0	—	3,8
								CHATEAU X., SAUTERNES							
1947	15°3	7°6	22°9	184	3,51	94	35	10,3	45	14,4	3,3	25,3	4,0	—	7,0
1948	15°4	6°3	21°7	124	3,33	87	16	16,3	25	12,9	2,5	20,6	5,0	—	7,2
1949	15°0	6°6	21°6	166	3,77	77	35	17,2	31	6,9	3,2	24,4	4,5	—	6,0
1950	14°7	7°0	21°7	150	3,85	85	39	23,6	39	8,6	4,5	26,2	4,5	—	7,0

Sauf indication spéciale les chiffres sont des milliéquivalents.

richesse totale atteint 15° à 22°9 ; ils présentent jusqu'à 150 g de sucre non fermenté. La plupart des constituants du vin s'y trouvent à doses plus fortes que dans les vins normaux.

Les teneurs en glycérol sont particulièrement élevées, grâce à la production par le *Botrytis*, grâce aussi vraisemblablement à la formation plus importante de glycérol par les levures dans un milieu aussi riche en sucre. Dans les exemples donnés, les teneurs varient de 11 g à 17 g par litre. C'est là une des principales caractéristiques de ces vins.

Du point de vue acidimétrique, ils présentent des acidités de titration relativement élevées qui peuvent atteindre 5,0 g par litre en acide sulfurique. Cependant leur acidité réelle reste faible et leur pH dépasse le plus souvent 3,5. C'est l'acide malique qui est l'acide principal de ces vins ; il varie ici de 1,7 g à 4 g par litre. L'acide tartrique peut tomber au-dessous de 1 g. L'acide lactique est également très faible et ne dépasse pas les quantités qui sont habituellement formées au cours de la fermentation alcoolique pure. Dans ces conditions de vinification, il n'y a donc jamais intervention de bactéries mololactiques et, du reste, des essais directs en vue de provoquer cette fermentation dans des vins liquoreux, avant sulfitage, ont toujours échoué.

En dehors de toute cause d'altération et par le jeu normal de l'action du *Botrytis* et de la concentration, l'acide acétique peut atteindre des taux assez élevés ; des acidités volatiles de l'ordre du gramme par litre sont courantes. Enfin, l'acide citrique, fort variable d'un vin à un autre, arrive parfois presque à 1 g par litre ; pour plus de la moitié des vins analysés, il dépasse 0,5 g. Comme nous l'avons établi dans l'étude de la surmaturation du raisin les doses élevées de cet acide ne proviennent pas d'une formation par le *Botrytis*, mais du seul phénomène de concentration.

Enfin dans tous les vins provenant de raisins pourris, on note la présence d'un acide qui avait échappé jusqu'à maintenant aux analyses : l'acide gluconique. Cet acide qui ne se trouve pas dans les vins issus de raisins sains, permet d'établir une discrimination précise entre ceux-ci et ceux provenant de vendange botrytisée (31). Sa teneur représente même, dans une certaine mesure, l'importance de l'attaque du raisin par le champignon.

L'acide gluconique du moût, n'étant pas transformé par la fermentation, se retrouve intégralement dans le vin. Nous avons rassemblé dans le tableau XVI quelques résultats de nos analyses sur les vins blancs de la Gironde. Les vins blancs de la région des Graves, qui proviennent presque toujours de raisins cueillis après un début de pourriture, même pour la production de vins secs ou peu sucrés, présentent de 1,5 à 3,2 méq, soit de 0,29 à 0,82 g par litre. Les vins moelleux et liquoreux des Premières Côtes et de Sainte-Croix-du-Mont ont de 2,6 à 5,2 méq (0.51 g à 1,02 g). Les régions à pourriture noble caractérisée donnent les vins les plus riches

en acide gluconique. A Sauternes et Barsac, les teneurs de cet acide vont de 3,0 à 12,6 méq, soit du demi-gramme à 2 g et demi.

TABLEAU XVI

Acide gluconique dans les vins blancs de la Gironde

Origine des vins	Degrés	Densité Baumé	Richesse totale	Acide gluconique en méq
Vins blancs secs de Graves:				
Léognan 1952	12°5			1,5
Cabanac 1952	12°4			2,1
Castres 1952	12°4			2,1
Cérons 1951	13°6			2,4
Portets 1951	14°0			4,2
Vins blancs de la rive droite de la Garonne:				
Quinsac 1952	11°2	1°2	12°4	2,6
Camblanes 1952	11°5	0	11°5	2,6
Sainte-Croix-du-Mont 1950	12°8	3°0	15°8	2,9
Langoiran 1951	15°1	4°0	19°1	3,2
Cénac 1950	12°5	1°9	14°4	3,6
Sainte-Croix-du-Mont 1950	13°4	3°3	16°7	3,6
Sainte-Croix-du-Mont 1949	13°1	3°5	16°6	4,2
Cadillac 1950	15°2	4°2	19°4	5,2
Vins blancs de Sauternes et de Barsac:				
R 1949	13°3	5°9	19°2	3,9
R 1950	13°4	5°0	18°4	3,3
R 1951	13°7	3°4	17°1	3,0
DV 1949	13°0	9°5	22°5	5,7
DV 1950	15°0	4°5	19°5	6,2
DV 1951	16°0	0°5	16°5	7,6
M 1949	14°8	3°9	18°7	12,6
M 1950	14°6	4°7	19°3	10,4
C 1949	14°5	4°8	19°3	4,6
C 1950	14°0	6°3	20°3	4,6
C 1951	13°9	1°3	15°2	5,5
RS 1951	13°5	3°5	17°0	2,5
Ca 1949	13°3	3°7	17°0	5,5
Ca 1950	13°6	3°1	16°7	5,3

Il semble y avoir une relation grossière entre la quantité d'acide gluconique et la richesse totale du vin, mais cet acide semble être aussi une caractéristique du cru. On peut remarquer pour un même cru le peu de variation qui existe dans les teneurs en acide gluconique d'une récolte à une autre, pourtant de qualités fort différentes.

On possède donc dans le dosage de l'acide gluconique, un moyen de confirmer l'authenticité des vins liquoreux obtenus grâce au concours de la pourriture noble. D'autre part il y a lieu de réserver à cet acide, qui n'y avait jamais été signalé, une place dans la composition des vins.

C'est presque un lieu commun de dire que la composition du vin est finalement le reflet des différents phénomènes physiologiques qui se sont succédés pour sa préparation. Chaque microorganisme qui intervient

(levures bactéries), concourt à donner au vin sa personnalité, chaque condition de fermentation influe sur la composition finale du produit. De même les vins liquoreux de la Gironde doivent leur composition particulière et leur qualité si exceptionnelle à la fois à l'action physiologique du *Botrytis* et à la concentration qui est aussi une des conséquences de l'action du *Botrytis* sur le raisin.

CHAPITRE III

ÉTUDE DES FERMENTATIONS DES ACIDES MALIQUE ET CITRIQUE PAR LES BACTÉRIES LACTIQUES

On appelle fermentation malolactique ou désacidification biologique des vins, ou parfois fermentation secondaire, une transformation biologique par des bactéries, conduisant en général à une amélioration des qualités organoleptiques du produit. Le phénomène essentiel de cette transformation est une diminution de l'acidité par fermentation de l'acide malique : cet acide qui est diacide est transformé en acide lactique monoacide suivant la réaction :

$$COOH — CH_2 — CHOH — COOH \rightarrow CH_3 — CHOH — COOH + CO_2$$

Nous étudions dans ce chapitre d'une part le mécanisme de cette fermentation, d'aure part ses circonstances et ses conséquences particulièrement dans le cas des vins blancs issus de vendanges saines ou de vendanges botrytisées.

Koch a le premier montré que les bactéries sont capables de détruire l'acide malique du vin. Seifert (1) a le premier isolé l'agent ou plutôt un agent de cette transformation et montré qu'il forme aux dépend de l'acide malique, de l'acide lactique suivant la réaction précédente ; c'est un diplocoque qu'il a nommé *Micrococcus malolacticus*. Par la suite divers types de bactéries capables de réaliser cette transformation ont été isolées, telle *Bacterium gracile*. Seifert a en outre montré que l'acide lactique formé est de l'acide inactif ; ce fait a été confirmé par Dutoit et Duboux.

Par la suite de très nombreux chercheurs, œnologues et biochimistes, se sont intéressés au problème de la fermentation malolactique : Müller-Thurgau et Osterwalder (2), Lüthi et Rentschler (3) en Suisse, Rippel (4) et Schanderl (5) en Allemagne, Garino-Canina en Italie (6). En France, ce sont Moreau et Vinet (7), Ferré (8), Ribéreau-Gayon (9 et 10) et Peynaud (11) qui ont étudié cette fermentation. La plupart des auteurs cités considèrent que cette transformation est généralement bienfaisante et souvent même nécessaire. Ce point de vue a cependant été contesté par les spécialistes des vins de consommation courante. On doit à M. Ribéreau-Gayon cette notion importante qu'il n'existerait pas de grands vins rouges de Bordeaux sans cette transformation : elle conduit en effet à un assouplissement du vin et à un affinement, à une modification importante de la couleur et du bouquet ; elle est le premier acte et certainement l'essentiel du vieillissement.

Mais la fermentation malolactique, son processus et ses conséquences

n'ont pas été étudiés jusqu'à maintenant dans le cas qui nous a toujours particulièrement intéressé dans notre travail, des vins blancs du Bordelais issus de vendanges plus ou moins botrytisées et sulfitées, conditions très particulières qui ont une évidente répercussion sur les transformations microbiologiques du vin. Il était certain que cette fermentation se présenterait dans ces vins avec des aspects particuliers qu'il nous a paru intéressant d'étudier.

D'autre part on ne connaît pas le mécanisme intime de la fermentation malolactique et aucune hypothèse n'a été faite à son sujet. Selon Rippel (4) la réaction écrite précédemment serait impossible parce que endothermique. Selon certains il ne se forme pas seulement de l'acide lactique et du gaz carbonique ; il apparaîtrait une faible quantité d'acide acétique qui, selon Rentschler, pourrait atteindre 10 p. 100. Nous avons abordé ce problème du mécanisme, dans le cas où la molécule décomposée est non l'acide malique, mais l'acide citrique.

En effet, au cours de la fermentation malolactique des vins, on constate que l'acide citrique disparaît également et plus ou moins complètement. Aussitôt après la fermentation alcoolique les vins contiennent toujours de petites quantités d'acide citrique de 3 à 6 méq par litre, provenant surtout du raisin et, pour une faible part, de la fermentation alcoolique elle-même ; mais les vins vieux ne renferment plus d'acide citrique, du moins les vins conservés sans dose notable d'acide sulfureux.

Cette décomposition bactérienne de l'acide citrique a été observée depuis longtemps. Müller-Thurgau et Osterwalder (*loc. cit.*) ont montré que dans un milieu au bouillon de levure, il se forme à partir de l'acide citrique, surtout de l'acide acétique et un peu d'acide lactique. Cette production importante d'acide acétique, augmentant l'acidité volatile des vins, a été confirmée par la suite par divers auteurs.

On sait d'autre part que l'acide citrique du lait conduit par fermentation lactique à la formation de produits acétoïniques, notamment au diacétyle qui joue un rôle important dans l'arôme des beurres (12). Cependant Deffner (13) qui a étudié en 1938 le mécanisme de la fermentation de l'acide citrique en milieu neutre par les bactéries isolées de la levure de bière, n'envisage pas, dans son mémoire, la formation de corps acétoïniques.

Nous avons pu apporter des faits et des interprétations nouvelles sur la nature des produits secondaires formés et les mécanismes chimiques de ces transformations bactériennes. Nous avons surtout porté notre attention sur la fermentation de l'acide citrique, mais ces notions seront en partie applicables à la fermentation de l'acide malique. Nous exposerons d'abord ces questions d'ordre théorique avant de donner nos observations d'ordre technique concernant les conditions de la fermentation malolactique.

I. — Etude théorique

Transformation de l'acide citrique par les bactéries lactiques

Nous nous sommes proposés de rechercher les proportions des différents produits de la fermentation de l'acide citrique par les bactéries malolactiques travaillant dans les conditions des vins, c'est-à-dire à des pH assez bas et le mécanisme de cette fermentation.

Deffner a trouvé que dans cette fermentation une molécule d'acide citrique donne 1,3 à 1,8 molécule d'acide acétique ; 0,1 à 0,33 molécule d'acide formique ; 0,11 à 0,22 molécule d'acide succinique, 2 molécules de gaz carbonique et des traces d'alcool et d'éthanol. L'acide oxalacétique, étudié dans les mêmes conditions par cet auteur, donne les mêmes proportions des produits de décomposition que l'acide citrique, sauf pour l'acide acétique : une molécule d'acide oxalacétique donne 0,3 à 0,8 molécule seulement d'acide acétique, soit à peu près une molécule de moins que l'acide citrique. Ces résultats permettent à cet auteur de penser qu'au cours de la fermentation lactique, la molécule d'acide citrique est d'abord scindée en acide oxalacétique et en acide acétique.

A partir du dépôt d'un vin qui venait de subir une fermentation malolactique typique, nous avons isolé et purifié dans un vin à pH 3,4 riche en acide malique et additionné de gélose, une bactérie présentant les caractères morphologiques et physiologiques de *B. gracile* : elle ne décompose ni l'acide tartrique, ni le glycérol quel que soit le pH ; elle décompose les sucres aux pH élevés.

La décomposition de l'acide citrique par cette bactérie a été ensuite étudiée d'une part en milieu simple à base d'eau de levure, d'autre part dans un vin. Les cultures étaient effectuées dans des flacons obturés avec des bouchons de liège stérilisés, et conservés quelques semaines à 25°. Les résultats sont exprimés dans les tableaux XVII et XVIII. La première colonne de chaque tableau est relative au liquide témoin ensemencé sans addition d'acide citrique ; elle indique les produits formés par la décomposition d'autres produits que l'acide citrique et qu'il y aura lieu de déduire des nombres des colonnes suivantes.

Le 2,3 butanediol ($CH_3 — CHOH — CHOH — CH_3$), l'acétylméthylcarbinol ou acétoïne ($CH_3 — CHOH — CO — CH_3$) et le diacétyle ($CH_3 — CO — CO — CH_3$) ont été dosés par la réaction de Lemoigne, selon les techniques très précises d'Hooreman (14), après avoir chassé l'alcool, selon le mode opératoire décrit par Peynaud et Mlle Lafon (15).

Il résulte de ces chiffres que la décomposition de l'acide citrique n'a pas fourni d'acide lactique (parfois une très faible quantité), mais, avec beaucoup de CO_2, beaucoup d'acide acétique (1,25 à 1,5 molécules pour 1 molécule d'acide citrique), et une forte proportion de corps acétoïniques.

Tableau XVII

Fermentation de l'acide citrique en milieu simple

(Les acides sont en milliéquivalents par litre, les corps acétoïniques en millimolécules par litre)

	Sans acide citrique	+ 120 méq d'acide citrique			
	pH 4,02	pH 3,32	pH 3,70	pH 4,02	pH 4,11
Variation de l'acidité de titration		— 58	— 60	— 60	— 53
Acide acétique	+ 3,1	+ 56,2	+ 51,6	+ 54,1	+ 52
Acide lactique	+ 8,1	+ 8,5	+ 8,3	+ 7,9	+ 10
Acide citrique	0	— 119,7	— 119,6	— 120	— 119,6
Somme des variations		— 55	— 59,7	— 58	— 57,6
Corps acétoïniques :					
2,3 butanediol	0	4,3	2,4	5,1	2,8
Acétoïne	0	5,5	11,1	5,3	6,5
Diacétyle	0	0,2	0,03	0	0,08
Somme	0	10,0	13,5	10,4	9,4

Tableau XVIII

Fermentation de l'acide citrique dans un vin

(Les acides sont en milliéquivalents par litre, les produits acétoïniques en millimolécules par litre)

	Sans acide citrique	+ 30 méq d'acide citrique
		pH 3,62
pH après fermentation		3,80
Acide de titration avant fermentation	83	88
Acide de titration après fermentation	81	70
Variation	— 2	— 18
Acide acétique	0	+ 14,9
Acide lactique	+ 2	+ 2,6
Acide citrique	0	— 31,6
Acide malique	— 4	— 4,0
Somme des variations	— 2	— 18,1
Corps acétoïniques :		
2,3 butanediol	9,2	12,0
Acétoïne	0,4	0,2
Diacétyl	0,01	0,1
Somme	9,6	12,2

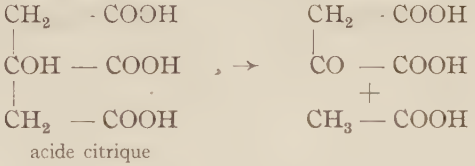
Leur somme est à peu près constante ; elle varie de 0,25 à 0,32 molécule par molécule d'acide citrique.

Cependant la nature de ces corps varie avec le milieu : alors que sur bouillon de levure il se forme généralement davantage d'acétoïne que de butanediol, dans le vin il se forme uniquement du butanediol et même l'acétoïne déjà présente diminue sensiblement. Dans l'eau de levure, il se forme des quantités notables de diacétyle ; dans le vin, la teneur en diacétyle n'est pas modifiée. Ces différences de comportement sont vraisemblablement liées à la nature différente des systèmes d'oxydoréduction qui existent entre les deux milieux. La diminution de l'acétoïne des vins, au cours de l'attaque de leurs constituants par des bactéries lactiques de maladie, avait déjà été observée (16).

Cette formation du butanediol dans les vins par les bactéries agissant sur l'acide citrique est un fait nouveau pour l'œnologie. Dans un vin renfermant à l'origine 5 méq d'acide citrique il pourra se former par cette voie 45 mg de butanediol, dose assez faible il est vrai ; elle pourrait atteindre 100 mg dans un vin additionné d'acide citrique.

Réactions intermédiaires de la dégradation de l'acide citrique

Les travaux antérieurs suggèrent le passage par l'acide oxalacétique et l'acide pyruvique selon les réactions :



acide citrique

acide oxalacétique — acide pyruvique

En effet la première réaction est admise par Deffner. Hirsch (17) admet que le précurseur des corps acétoïniques est l'acide pyruvique, Pien (12) l'admet également dans le cas des bactéries de la crème du lait ; Hooreman (14) a récemment montré le fait pour *B. subtilis*. Neuberg et Gorr (18) ont montré la formation d'acétoïne à partir de l'acide oxalacétique. D'ailleurs la décarboxylation enzymatique de l'acide oxalacétique est connue par les travaux de Krampitz et Werkmann (19) et Wieland et Collaborateurs (20).

Il convenait donc d'étudier le comportement des bactéries malolactiques directement vis-à-vis de l'acide pyruvique (21). Les essais furent faits sur le milieu à l'eau de levure contenant 40 méq d'acide pyruvique par litre, tamponné par le bitartrate à pH 4,02. On a laissé un mois à l'étuve

à 25°. Tout l'acide pyruvique avait disparu à ce moment ; bien entendu, l'acide tartrique restait intact. Un exemple de nos résultats est reproduit sous forme de bilan de transformation des acides dans le tableau XIX.

TABLEAU XIX

Fermentation de l'acide pyruvique en milieu simple

(Les acides sont en milliéquivalents par litre, les produits acétoïniques en millimolécules par litre)

pH après fermentation	4,65
Variation de l'acidité de titration	— 27
Acide acétique	+ 6,3
Acide lactique	+ 3,7
Acide pyruvique	— 40
Somme algébrique des variations	— 30
Corps acétoïniques :	
2,3 butanediol	11,2
Acétoïne	17,9
Diacétyle	0
Somme	29,1

Ainsi une molécule d'acide pyruvique donne 0,16 molécule d'acide acétique, soit assez bien une molécule de moins que la molécule citrique. (L'acide lactique provient des éléments de l'eau de levure.) Par contre, les corps acétoïniques se retrouvent à des concentrations un peu plus élevées : 0,36 par molécule. L'acide pyruvique est plus facilement condensé que réduit. Malgré quelques divergences quantitatives, la similitude dans la nature des produits formés et dans les rendements obtenus avec les acides pyruvique et citrique rend vraisemblable le passage par l'acide pyruvique.

Ces résultats rendent très plausible l'hypothèse de DEFFNER.

En conséquence, les réactions de formation des divers produits de la fermentation de l'acide citrique peuvent être écrites, à partir de l'acide pyruvique, sans préjuger des stades intermédiaires, de la façon suivante :

$$2CH_3 \cdot CO \cdot COOH \rightarrow CH_3 \cdot CO \cdot CHOH \cdot CH_3 + 2CO_2$$

$$CH_3 \cdot CO \cdot COOH + H_2O \rightarrow CH_3 \cdot COOH + CO_2 + 2H$$

$$2CH_3 \cdot CO \cdot COOH \rightarrow CH_3 \cdot CO \cdot CO \cdot CH_3 + 2CO_2 + 2H$$

En réalité, il n'y a pas de dégagement d'hydrogène et ces deux réactions sont couplées avec la suivante.

$$2CH_3 \cdot CO \cdot COOH + 2H \rightarrow CH_3 \cdot CHOH \cdot CHOH \cdot CH_3 + 2CO_2$$

Toutes ces réactions peuvent d'ailleurs être aussi bien écrites à partir de l'acide oxalacétique ou même à partir de l'éthanal si l'on admet que, dans les réactions donnant lieu à un dégagement de gaz carbonique, les

condensations font suite aux décarboxylations au lieu de les précéder. Ceci ne changerait rien aux bilans dont nous allons parler.

Dans une fermentation de l'acide citrique, la somme des produits formés, chacun d'eux étant affecté d'un coefficient tiré de la formule supposée de sa formation, doit être égale à l'acide citrique fermenté.

Désignons par c le nombre de milliéquivalents d'acide citrique disparu par litre, par e le nombre de milliéquivalents d'acide acétique apparu, par a et b le nombre de millimolécules d'acétoïne et de 2,3 butanediol apparu. On négligera pour simplifier le diacétyle, ainsi que les petites quantités d'acide lactique qui ont pu apparaître dans le vin. D'autre part rappelons qu'une fraction de l'acide acétique formé $\left(\text{soit } \frac{c}{3}\right)$ provient de la première scission de l'acide citrique, si bien que seulement $e - \frac{c}{3}$ provient de l'acide oxalacétique ou ce qui revient au même de l'acide pyruvique.

Dans ces conditions il résulte des équations écrites précédemment que $\left(e - \frac{c}{3}\right)$ méq d'acide acétique proviennent de 2 méq d'acide citrique et que a (ou b) millimolécules d'acétoïne (ou de butanediol) proviennent de $4a$ (ou $4b$) milliéquivalents d'acide citrique, si bien que l'on doit avoir :

$$c = \frac{c}{3} + 2\left(e - \frac{c}{3}\right) + 4a + 4b$$

Le tableau XX relatif aux déterminations précédentes montre que la relation se vérifie bien dans le cas des vins, moins bien dans le cas de l'eau de levure, comme s'il s'y formait d'autre corps.

TABLEAU XX

Bilan de la fermentation de l'acide citrique

(Les acides sont exprimés en milliéquivalents, les corps acétoïniques en millimolécules)

	Eau de levure à pH 4,02	Vin à pH 3,62
Acide citrique disparu (c)	*120*	*31,6*
Acide acétique formé (e)	51	14,9
Acide acétique formé :		
1° par le dédoublement de l'acide citrique $\left(\frac{c}{3}\right)$	40	10,5
2° par le dédoublement de l'acide oxalacétique $\left(e - \frac{c}{3}\right)$	11	4,4
Acétoïne formée (a)	5,3	0
Butanediol formé (b)	5,1	2,8
c calculé :		
$c = \frac{c}{3} + 2\left(e - \frac{c}{3}\right) + 4a + 4b$	*103,6*	*30,5*

Nous obtenons une vérification suffisamment bonne, dans le cas du vin au moins, pour que nous puissions penser d'une part que tous les corps formés ont été reconnus et dosés, d'autre part que les équations hypothétiques précédentes, d'ailleurs *a priori* probables, représentent la réalité des phénomènes.

Au lieu de ces bilans complets de la fermentation, on peut établir simplement le bilan de l'hydrogène, dans le cas du vin, en négligeant la formation de diacétyle. Le butanediol formé, qui consomme 2 H, doit être égal à l'acide acétique apparu à partir de l'acide oxalacétique dont la formation fait apparaître 2 H. Cette relation se vérifie bien.

En résumé, les chiffres expérimentaux correspondent assez bien avec les chiffres théoriques, pour qu'on puisse considérer comme démontré le passage par le stade oxalacétique (ou ses produits de décarboxylation) et les réactions que nous avons formulées, dans la fermentation de l'acide citrique par les bactéries lactiques. Il est bien entendu, d'ailleurs, que les données générales de la biochimie rendent ces réactions très vraisemblables.

Transformation de l'acide malique par les bactéries lactiques

L'étude précédente de la fermentation de l'acide citrique permet de discuter le mécanisme de la fermentation malolactique dont la réaction globale a été donnée plus haut. Le schéma le plus probable est celui admettant comme premier terme de la réaction une déshydrogénation conduisant à l'acide oxalacétique :

$$COOH \cdot CH_2 \cdot CHOH \cdot COOH \rightarrow COOH \cdot CH_2 \cdot CO \cdot COOH + 2H$$

L'acide oxalacétique est ensuite décarboxylé :

$$COOH \cdot CH_2 \cdot CO \cdot COOH \rightarrow CH_3 \cdot CO \cdot COOH + CO_2$$

et l'acide pyruvique formé est réduit en acide lactique par l'hydrogène libéré dans la première réaction, ce qui nécessairement conduit à un acide lactique inactif et expliquerait les observations de Dutoit et Duboux :

$$CH_3 \cdot CO \cdot COOH + 2H \rightarrow CH_3 \cdot CHOH \cdot COOH$$

Au premier abord il semble inexplicable, les produits de la fermentation des acides malique et pyruvique n'étant pas les mêmes, que ces deux fermentations comportent l'une et l'autre les mêmes intermédiaires. Mais il faut considérer que dans la fermentation lactique de l'acide malique, le sort de l'acide pyruvique ayant à sa disposition la quantité d'hydrogène nécessaire à sa réduction, ne saurait être le même que lorsque cet acide est à l'origine seul dans le milieu. Il en est un peu ainsi, pour donner un

autre exemple dans la chimie des fermentations, lorsque de l'éthanal est ajouté en surplus à une fermentation alcoolique ; il donne alors de l'acide acétique, de l'acide succinique, du butanediol et il ne subit pas le sort habituel de l'éthanal dans la fermentation alcoolique qui est sa réduction en alcool éthylique, parce qu'il ne trouve pas en face de lui l'hydrogène nécessaire.

Comme pour la fermentation de l'acide citrique, les acides oxalacétique et vraisemblablement pyruvique restent donc bien également les termes intermédiaires les plus probables de la fermentation malolactique, et on s'explique que les mêmes bactéries ne forment pas (ou pas sensiblement) d'acide lactique à partir de l'acide citrique et ne forment que de l'acide lactique à partir de l'acide malique, résultat surprenant au premier abord.

II. — Etude des conditions techniques de la fermentation malolactique

Dans les conditions naturelles de la production et de la conservation des grands vins rouges, la fermentation malolactique se produit presque toujours ; il n'en est pas de même dans le cas des vins blancs. Il importait de préciser la nature et l'importance des facteurs qui interviennent pour la favoriser ou l'empêcher ou, tout au moins, la retarder ; il importait de mieux connaître certains effets de l'aciditié du milieu, de la présence d'oxygène, de l'addition d'acide sulfureux, également l'influence de la nature du cépage et de la durée de conservation du vin.

Influence du cépage

Il était intéressant de suivre la fermentation malolactique des vins de cépages purs. Nous avons donc vinifié séparément les trois cépages rouges fins du Bordelais : Malbec, Cabernet et Merlot. Après la fermentation alcoolique qui a duré 15 jours, des échantillons des trois vins obtenus ont été prélevés, stérilisés par chauffage à 60°, puis analysés.

Le tableau XXI donne la composition comparée des trois vins obtenus. Ce tableau permet des comparasoins que l'on a rarement l'occasion de faire, les vins du Bordelais étant toujours obtenus à partir d'un mélange de cépages. La correspondance satisfaisante entre la somme des anions et la somme des cations prouve que les dosages effectués sont corrects, en particulier celui de l'acide malique, le plus difficile et le plus important.

Il résulte des données du tableau XXI qu'au moment du prélèvement, le vin de Merlot avait subi complètement la fermentation malolactique avec décomposition de l'acide citrique, que le vin de Cabernet, un peu

plus acide, était en cours de fermentation malolactique, enfin, que le vin de Malbec encore plus acide n'avait pas encore subi cette fermentation.

Tableau XXI

Fermentation malolactique de vins provenant de divers cépages

Sauf indication contraire, tous les chiffres sont des milliéquivalents par litre

	Vin de Malbec	Vin de Cabernet	Vin de Merlot
Alcool	11°1	11°3	11°8
Sucre	1,35	1,35	1,4
Glycérol	8,8	8,1	8,7
Indice de permanganate :			
Vin total	66,5	77,5	76,5
Colorant	52	61,5	61
Tanin	17	16,7	17
pH	3,25	3,25	3,5
Acidité de titration	102,7	84,4	69,9
Alcalinité des cendres	23,0	21,6	19,2
Ammoniaque	3,8	2,4	1,2
Somme des cations	*129,5*	*108,4*	*90,3*
Acide tartrique	52,3	50,0	42,7
— malique	36,5	13,6	1,5
— citrique	3,4	3,8	0,8
— lactique	12,6	17,6	21,4
— succinique	16,1	16,1	16,1
— acétique	5,8	5,5	8,3
Somme des anions	*126,7*	*106,6*	*90,8*
Fermentation malolactique supposée achevée :			
Diminution d'acidité calculée	18,2	6,8	0,7
Acide lactique calculé	30,8	24,4	22,1
Acidité de titration calculée	84,5	77,6	69,2

En somme la fermentation a été d'autant plus aisée que l'acidité initiale était plus faible.

Il est intéressant de rapprocher ces résultats des analyses faites par Peynaud sur les moûts de 1937 et 1938 : le jus de Malbec est le plus riche en acide malique (50 à 56 méq), celui de Merlot le plus pauvre (19 à 24 méq), celui de Cabernet ayant un taux intermédiaire (38 à 39 méq). Par contre la concentration de l'acide tartrique (75 à 130 méq) n'est pas liée régulièrement à la nature du cépage ; cet acide précipite pour une très grande part sous forme de bitartrate de potassium au cours de la fermentation puis de la conservation. Finalement l'acidité du vin obtenu est liée à la concentration du moût en acide malique ; telle est la conception développée par Peynaud dont nous trouvons ici une application.

Les cépages les plus riches en acide malique, donnent les vins les plus acides, mais les chutes d'acidité, lorsque la fermentation malolactique est

terminée, sont plus importantes dans les vins les plus acides. Finalement la fermentation malolactique régularise dans une large mesure, l'acidité des vins de divers cépages ; elle atténue les écarts initiaux.

Influence de l'acidité

On sait que le pH des vins possède un effet sélectif et réalise, en quelque sorte, un triage des bactéries susceptibles d'attaquer tel ou tel constituant des vins et des constituants susceptibles d'être décomposés. A mesure que le pH s'abaisse, de nouveaux types de bactéries se trouvent inhibés. D'après les observations de Ribéreau-Gayon l'acide malique est le plus aisément attaqué dès pH 3, l'acide tartrique au-dessus de pH 3,5 seulement, les sucres et le glycérol à des pH intermédiaires.

Nos expériences sur ce sujet ont consisté à ensemencer une série d'échantillons d'un même vin amené à des pH différents avec des bactéries lactiques apportées par des dépôts de vins divers. Les expériences ont porté sur plusieurs types de vins ainsi ensemencés.

Nous avons constaté que toutes ces bactéries décomposent l'acide malique, certaines dès pH 3, mais d'autres seulement à un pH plus ou moins supérieur à 3.

Il se trouve que ce sont les bactéries isolées des vins de pH élevé qui ne fermentent pas, ou difficilement, l'acide malique des milieux de pH relativement faibles ; au contraire, plus le pH du vin initial est faible, plus la bactérie agit à pH faible. Autrement dit le pH d'arrêt de bactéries provenant d'un vin, blanc ou rouge, est en rapport étroit avec le pH de ce vin.

Tableau XXII

Fermentation malolactique dans un vin à différents pH par des souches d'origines différentes

Les chiffres expriment les acidités de titration (AT) et volatiles (AV) en milliéquivalents par litre

pH		Témoin non ensemencé	Origine des souches				
			Vin rouge pH 3,3	Vin rouge pH 3,4	Vin rouge pH 3,6	Vin blanc pH 3,8	Vin blanc pH 3,87
2,95	A. T.	181	147	180	180	180	180
	A. V.	7,4	7,2	7,4	7,4	7,4	7,4
3,23	A. T.	160	114	109	160	157	160
	A. V.	7,4	7,4	7,2	7,2	7,4	7,4
3,40	A. T.	140	90	92	90	93	136
	A. V.	7,4	11,9	11,9	11,9	7,5	7,5
3,70	A. T.	108	74	74	63	73	79
	A. V.	7,5	11,9	10,2	6,2	7,5	9,7
4,15	A. T.	74	47	41	56	35	
	A. V.	7,5	11,9	7,5	7,9	11,9	

Par exemple le tableau XXII donne, pour un vin blanc ensemencé avec différents dépôts, les résultats obtenus après deux mois de conservation à la température du laboratoire (18°). La diminution de l'acidité de titration par rapport au témoin à même pH indique l'existence d'une fermentation malolactique. On reconnaît aussitôt le fait qui vient d'être exposé et qui s'explique par un effet sélectif du pH dans le vin d'où sont originaires les souches. Ce phénomène doit évidemment intervenir dans la conservation et les manipulations des vins.

On notera que dans l'expérience du tableau XXII, des augmentations notables d'acidité volatile, de l'ordre de 4 méq, ne se sont produites que pour les pH élevés, à pH 3,4 et au-dessus.

Influence de l'oxygène

Les bactéries malolactiques des vins qui appartiennent au groupe général des bactéries lactiques peuvent se développer en présence d'oxygène dissous dans le liquide. Elles ne sont nullement anaérobies, comme on l'affirme souvent en œnologie, en les opposant aux bactéries acétiques dont le développement exige l'existence prolongée d'une surface de contat entre le liquide et l'air atmosphérique. Ces bactéries, qui sont les agents de la fermentation malolactique et aussi des maladies des vins n'exigent pas ce contact ; elles vivent dans la masse du vin où même à la partie inférieure des récipients, mais elles ne sont nullement gênées par la présence d'oxygène dissous. Ces observations ont été faites par Müller-Thurgau, et plus récemment par Ribéreau-Gayon.

A partir des dépôts de vin, et à l'aide des techniques d'isolement sur milieu solide décrites par Ribéreau-Gayon, nous avons obtenu des cultures pures et nous avons constaté, ce qui confirme les conclusions des auteurs précédents, que toutes ces cultures peuvent se développer aussi bien dans des tubes en aérobiose simplement bouchés par de la ouate et maintenus à l'air, que dans des tubes placés à l'abri de l'air. On utiliserait des flacons clos contenant du pyrogallate de potassium qui absorbe très fortement l'oxygène ; les tubes de culture étant obturés par de la ouate, l'oxygène qu'ils renferment diffuse jusqu'à épuisement dans le bocal au fur et à mesure de l'absorption par le pyrogallate.

Le tableau XXIII relatif à une expérience particulière, prise entre plusieurs semblables, fait notamment ressortir ce fait que la désacidification se poursuit aussi bien à l'air qu'à l'abri de l'air. On observe parfois que la chute de l'acidité de titration, exprimée toujours en méq par litre, est plus rapidement complète en anaérobiose.

Mais l'état d'aération d'un milieu, et son influence à cet égard vis-à-vis du développement des microorganismes, ne peuvent être correctement définis que par son potentiel d'oxydo-réduction qui est une expression

du niveau plus ou moins oxydant ou plus ou moins réducteur du milieu. On conçoit combien il est difficile de définir en intensité et en durée un certain état d'aération par les conditions opératoires ; au surplus le milieu, selon sa composition, réagit très différemment à un apport déterminé d'oxygène.

Le tableau XXIII donne donc en même temps que la diminution de l'acidité de titration, le potentiel d'oxydoréduction mesuré à l'aide du rH-mètre Quéré, au moment où étaient effectués les titrages des acides. aussitôt après l'ouverture des tubes. Ces potentiels sont toujours exprimés en millivolts. Précisons que l'expérience comportait plusieurs tubes identiques et qu'un tube ne servait qu'à une seule détermination. Le tableau XXIII donne en même temps dans une autre colonne les potentiels des tubes identiques non encore ensemencés ; la comparaison des deux colonnes fait ressortir la manière dont le niveau d'oxydo-réduction du milieu réagit au développement des bactéries.

TABLEAU XXIII

Influence de l'oxygène sur la fermentation malolactique

pH et acidité de titration	Nombre de jours	En aérobiose			En anaérobiose		
		Potentiel sans ensemencement mv	Potentiel avec ensemencement mv	Diminution de l'acidité méq	Potentiel sans ensemencement mv	Potentiel avec ensemencement mv	Diminution de l'acidité méq
pH 3,21	8	540	500	22	370	310	35
Acidité	16	570	520	26	320	270	35
157 méq	24	550	535	29	330	280	35
pH 3,52	8		480	25	340	240	35
Acidité	16	550	490	29	340	255	35
135 méq	24	570	510	29	300	240	35
pH 3,83	8	540	480	32	330	240	35
Acidité	16	510	480	32	310	210	35
112 méq							

On voit que des conditions d'aération très différentes, clairement exprimées par un important écart de potentiel entre les essais en aérobiose et les essais en anaérobiose, modifient peu la marche de la fermentation malolactique. On voit, en outre, comme on pouvait s'y attendre, que par rapport aux potentiels des témoins non ensemencés, l'écart est plus important en anaérobiose qu'en aérobiose.

L'état d'oxydoréduction d'un milieu peut également s'exprimer par le rH calculé par la relation :

$$rH = \frac{E + 0{,}06\ pH}{0{,}03}$$

Dans l'expérience du tableau, XXIII, le rH est, lorsque varie le pH, plus constant que le potentiel ; il est voisin de 25 en aérobiose et de 16 en anaérobiose.

Influence de l'anaérobiose absolue

Une objection pouvait être faite à l'expérimentation précédente. Les vins dits « en anaérobiose » en réalité n'étaient placés à l'abri de l'air, dans des flacons renfermant du pyrogallate, qu'au moment où ils venaient d'être ensemencés, et leur potentiel initial, au temps 0, étaient en réalité le même que dans les vins dits « en aérobiose ». La différence de condition n'était réalisée que progressivement, et sans doute après qu'ait commencé le développement des bactéries.

Nous avons donc constitué d'autres expériences qui comportaient, en plus des conditions précédentes (aérobiose et anaérobiose,) une troisième série dite « en anaérobiose immédiate » dont les vins étaient placés à l'abri de l'air, sou pyrogallate, un mois avant l'ensemencement. Au moment de l'ensemencement, les tubes étaient rapidement sortis du bocal à pyrogallate et ; après introduction de quelques gouttes de culture, replacés aussitôt dans les bocaux. La diffusion d'oxygène dans ces conditions est infime ; le milieu est complètement privé d'oxygène, avec dès le départ un potentiel beaucoup plus bas que dans les autres conditions : moins de 300 mv au lieu de 460.

D'une manière plus précise tous les tubes avaient été placés un mois à l'avance sous pyrogallate ; ceux qui constituaient ensuite les séries « aérobiose continue » et « anaérobiose progressive » étaient saturées d'oxygène par des agitations dans l'air au moment de l'ensemencement.

Le tableau XXIV donne le résutat d'une expérience ainsi conduite. Les deux premières colonnes (aérobiose continue et anaérobiose progressive) qui correspondent exactement aux conditions de l'expérience du tableau XXIII (aérobiose et anaérobiose) donnent les mêmes résultats que celle-ci. Par contre, dans le cas d'« anaérobiose immédiate » que l'on pourrait également appeler anaérobiose continue ou absolue, la fermentation malolactique a été beaucoup plus pénible et même ne s'est pas accomplie à pH 3,45.

C'est là un résultat nouveau. Non seulement la présence d'oxygène ne gène pas la fermentation malolactique, ce qui est déjà contraire à certaines conceptions admises, mais en outre elle la favorise, et même un apport d'oxygène au milieu, au moins en petite quantité, doit être nécessaire dans certaines conditions.

Cette expérience, renouvelée plusieurs fois sur divers types de vin, n'a pas toujours donné des résultats aussi nets, mais en aucun cas l'anaérobiose absolue n'a favorisé la fermentation malolactique.

Tableau XXIV

Effet de l'anaérobiose absolue sur la fermentation malolactique

	Nombre de jours	En anaérobiose continue		En anaérobiose progressive		En anaérobiose immédiate	
		Potentiel mv	Diminution de l'acidité méq	Potentiel mv	Diminution de l'acidité méq	Potentiel mv	Diminution de l'acidité méq
pH 3,45	0	460	0	460	0	300	0
	6	440	8	300	8	310	0
	12	420	11	285	9	300	1
pH 3,82	0	450	0	460	0	260	0
	6	490	11	300	11	260	5
	12	470	11	260	11	270	6

Influence de l'acide sulfureux

Le tableau XXV résume des expériences effectuées pendant plusieurs années sur la vinification en blanc à partir de vendanges peu ou pas botrytisées. Les fermentations avaient toujours lieu en barriques de 225 litres. Le tableau rassemble les résultats des analyses effectuées en fin de fermentation, comparativement sur les vins issus de moûts non sulfités et sur les vins issus de moûts sulfités. Dans tous les cas l'addition d'acide sulfureux avait été faite avant fermentation.

Ces résultats sont présentés sous forme de bilans de variations dans lesquels, si les dosages sont corrects et si tous les acides ont été dosés, la somme algébrique des variations des acides doit être égale à la somme des variations de l'acidité de titration et de l'alcalinité des cendres. Cette dernière peut varier par précipitation de bitartrate de potassium ou de tartrate de calcium.

En outre, les mêmes dosages ont été faits, pour chaque vin du tableau, sur un fût sulfité et « débourbé », c'est-à-dire soutiré deux jours après sulfitage du moût afin de séparer la plus grande masse de « bourbes ». Les résultats analytiques ayant été en général très voisins de ceux concernant les fûts simplement sulfités, nous ne les faisons pas figurer sur le tableau.

En conclusion de ces expériences, on voit que la fermentation malolactique est générale et normale dans ce type de vin, mais que l'addition d'acide sulfureux l'empêche.

Tableau XXV

Sulfitage des moûts et fermentation malolactique des vins blancs

Les concentrations sont exprimées en milliéquivalents par litre

Date des analyses		pH	Sucre g	Acidité totale	Alcalinité des cendres	*Variation de l'acide corrigée*	Acide tartrique	Acide malique	Acide lactique	Acide citrique	Acide acétique	*Somme des variations des acides*
							Récolte 1948					
Novembre 1948	non sulfité			63			40,0	8,6	24,3	3,2	11,0	
	sulfité			77			49,6	32,6	14,0	4,0	7,2	
	différence			— 14	— 4,8	— *18,8*	— 9,6	— 24	+ 10,3	— 0,8	+ 3,8	— *20,3*
Avril 1948	non sulfité			76			35,6	0	18,4	3,8	9,9	
	sulfité			86			39,3	12,0	10,0	4,1	9,4	
	différence			— 10	— 1,8	— *11,8*	— 3,7	— 12,0	+ 8,4	— 0,3	+ 0,5	— *7,1*
							Récolte 1949					
Novembre 1949	non sulfité	3,44	2,9	70	19,5		36,1	0	14,5	2,3	12,5	
	sulfité	3,24	6,3	83	18,0		35,6	16,0	5,7	5,8	9,4	
	différence			— 13	+ 1,5	— *11,5*	+ 0,9	— 16	+ 8,8	— 3,5	+ 3,1	— *6,7*
Avril 1949	non sulfité		2,7	76	21		24,9	0	11,5	0,8	14,4	
	sulfité		3,2	86	24		30,2	18	3,2	4,3	8,4	
	différence			— 10	— 3	— *13*	— 5,3	— 18	+ 8,3	— 3,5	+ 6,0	— *12,5*
							Récolte 1950					
Novembre 1950	non sulfité	3,48	11,9	76	25,3		31,3	3	13,2	4,4	10,9	
	sulfité 50 m SO_2/l	3,36	10,9	91	28		37,3	23	3,1	4,7	10,6	
	différence			— 15	— 2,7	— *17,7*	— 6	— 20	+ 10,1	— 0,3	+ 0,3	— *15,1*
	sulfité 100 m SO_2/l	3,37	11,0	90	28,5		39,4	25	2,7	4,8	10,0	
	différence			— 14	— 3,2	— *17,2*	— 8,1	— 22	+ 10,5	— 0,4	+ 0,9	— *19,1*
	sulfité 200 m SO_2/l	3,35	12,2	91	29,4		41,2	24	4,0	4,0	11,5	
	différence			— 15	— 4,1	— *19,1*	— 10,9	— 21	+ 9,2	— 0,4	— 0,6	— *23,7*

Fermentation malolactique des vins blancs

Les résultats analytiques du tableau XXV font partie d'une expérimentation sur la vinification en blanc que nous avons poursuivie méthodiquement en 1948, 1949 et 1950.

Dans nos expériences de 1948, nous avons pu constater l'existence normale de la fermentation malolactique dans les vins blancs secs de la région des Graves produits à partir de raisins en majeure partie non atteints de pourriture. Nous avons constaté en même temps l'effet empêchant du sulfitage trop fort avant la fermentation ou encore intervenant trop tôt en fin de fermentation alcoolique.

En 1949, dans des expériences analogues, comportant toujours des fermentations en barriques de 225 litres, la fermentation malolactique était terminée à la fin de la fermentation en barriques, lorsque les moûts n'avaient pas reçu d'acide sulfureux. Par contre, comme en 1948, elle ne s'était pas produite dans les vins ayant reçu avant ou après la fermentation alcoolique 150 ou 200 mg d'acide sulfureux par litre, ces doses étant parfois utilisées en vinification pour réaliser le débourbage.

En ce qui concerne les caractères organoleptiques, on observait que les vins désacidifiés n'étaient pas beaucoup plus « moelleux » et « gras » que les vins vinifiés avec acide sulfureux ; ils paraissaient plutôt plus mous. D'autre part, ils avaient peu d'odeur, étaient moins fruités que les vins provenant de moûts sulfités.

A première vue, les effets de la fermentation malolactique paraissaient donc assez différents de ce qu'ils sont dans le cas des vins rouges. Au moins un peu d'acide sulfureux paraît nécessaire à la qualité de ces vins, et normalement c'est effectivement en présence d'un peu d'acide sulfureux au moins que ces vins sont présentés à la consommation.

Dans les mois qui ont suivi la récolte, ces caractères se sont accentués. En outre, les vins vinifiés avec 100 ou 150 mg d'acide sulfureux, s'étant alors désacidifiés comme le témoin non sulfité, présentaient les caractères de vins malades : gazeux, avec disparition du « fruité », très légère augmentation d'acidité volatile (2 à 3 méq), avec diminution de l'acidité de titration (5 à 6 méq). Mais il faut reconnaître que dans les conditions de la pratique normale, ces vins auraient été soutirés, aérés et légèrement sulfités. C'est pourquoi dans les expériences qui suivent, nous avons cherché à respecter ces conditions normales.

En 1950 nous avons répété à nouveau ces expériences et réalisé des sulfitages de moût à raison de 50, 100 et 200 mg d'acide sulfureux par litre. Ces sulfitages ont légèrement retardé le départ de la fermentation alcoolique qui a été conduite, comme précédemment, en barriques de 225 litres. A la fin de la fermentation alcoolique, les vins non sulfités

avaient subi la fermentation malolactique ; tandis que les vins sulfités, même à faible dose, étaient restés plus acides.

Ici encore, au point de vue des caractères organoleptiques, les vins paraissaient d'autant mieux réussis qu'ils avaient été plus sulfités.

Ces vins ont été soutirés 15 jours après la fin de la fermentation alcoolique et additionnés de 50 mg par litre d'acide sulfureux, puis analysés et dégustés en décembre. La fermentation malolactique ne s'était toujours pas produite dans les vins additionnés de 100 ou 300 mg par litre d'acide sulfureux.

D'une façon générale, les caractères organoleptiques s'étaient beaucoup améliorés par cette opération. L'odeur agréable de ce type de vin s'était développée, en particulier dans les vins désacidifiés ; les vins sulfités avant fermentation étaient ici nettement plus acides et moins « coulants » que les vins non sulfités.

Finalement il apparaît que la fermentation malolactique est un phénomène général dans le cas des vins blancs du Bordelais issus de vendanges non attaquées par le *Botrytis cinerea* ou pour une faible proportion seulement, à la condition que les moûts ne soient pas sulfités, ou très légèrement ; et il apparaît que sous réserve que le vin produit subisse des soins normaux comportant des aérations et des sulfitages, cette fermentation malolactique est ici encore un facteur de qualité ; cette fermentation reprend dans ces vins l'intérêt qu'elle offre dans le cas général.

Comme dans le cas des vins rouges, on doit considérer trois ordres de faits essentiels :

1° Une acidité un peu élevée s'oppose à la qualité, au développement du « gras et du mœlleux » du vin, même si le vin n'est pas vert à proprement parlé ;

2° La fermentation malolactique est un puissant facteur de diminution de l'acidité, qui se rapproche ainsi du taux optimum ;

3° L'acide sulfureux ajouté, même à faible dose avant ou après la fermentation principale, s'oppose à la fermentation malolactique.

Ces faits ne sont pas nouveaux pour les vins blancs en général car ils ont été signalés depuis longtemps en Suisse, en Italie, en Bourgogne et en Anjou, mais ils sont nouveaux pour les vins blancs du Bordelais. Sans doute tous les vins blancs du Bordelais ne subisent pas cette fermentation malolactique ; seuls les vins issus de vendanges non ou peu pourries l'ont manifesté avec ses conséquences heureuses, par exemple les vins secs de la région de Blaye ou de Castillon.

Les expériences relatées ici illustrent la nécessité pratique d'étudier et de préciser, beaucoup plus qu'il n'a été fait jusqu'à maintenant, les détails des procédés de vinification, si l'on veut obtenir sûrement la meilleure qualité.

Nous avons précédemment vu que dans le cas des vins de Sauternes

issus de vendanges fortement botrytisées, il n'est généralement pas possible, même sans anhydride sulfureux, d'obtenir une diminution d'acidité par fermentation malolactique. Si les progrès qu'il est possible d'apporter à l'élaboration des grands vins blancs secs sont pour une grande part subordonnés au respect des conditions qui permettent un meilleur développement de la fermentation malolactique, par contre dans le cas des grands vins blancs doux, on ne peut semble-t-il rien attendre de ces conditions et toute l'attention doit être portée sur l'activité du *Botrytis conerea*.

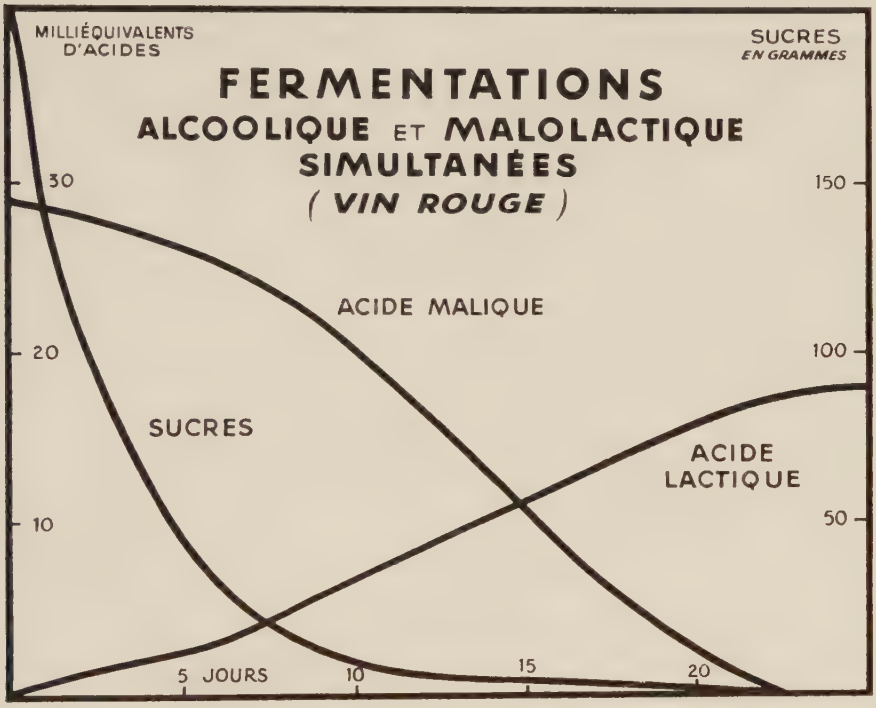


Fig. 7.

Fermentation alcoolique et fermentation malolactique

Nous avons pu observer dans une vinification en rouge et dans une vinification en blanc, une fermentation malolactique accompagnant la fermentation alcoolique, débutant bien avant la fin de la fermentation complète du sucre. Dans l'un et l'autre cas, nous avons suivi par l'analyse les variations de l'acide malique et de l'acide lactique, au cours de la fermentation alcoolique, ce qui, pensons-nous, n'avait pas encore été effectué.

Dans le cas du vin rouge qui a été fermenté en cuve (figure 7) l'acide malique a commencé de diminuer dès le commencement de la fermentation, puis a subi une chute notable et rapide à partir du moment où

il restait encore 20 g de sucre par litre. Au moment de l'écoulage de la cuve, ou décuvaison, la transformation était complète.

Dans le cas du vin blanc qui a été fermenté en barrique de 225 litres (figure 8) la disparition de l'acide malique a eu lieu en même temps que la disparition du sucre ; les bactéries peuvent donc décomposer l'acide malique sans décomposer les sucres et former, à partir d'eux, de notables proportions d'acides lactique et acétique. On sait d'ailleurs par les travaux de Peynaud (22), qu'une fraction valable de l'acide malique est fermentée par la levure.

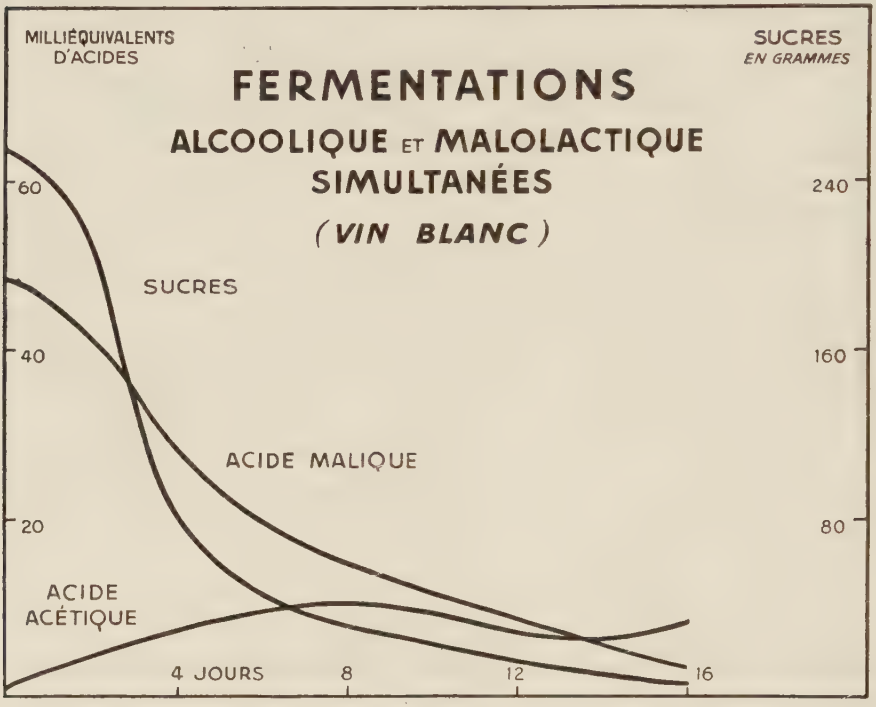


Fig. 8.

Cependant, dans une expérience où il y a eu arrêt de fermentation, laissant 18 g de sucre non fermenté, l'acide lactique était plus élevé de 6 méq et l'acidité volatile de 3 méq que dans le témoin ayant subi les deux fermentations sans accident. Environ 1 g de sucre avait été décomposé par les bactéries.

Dans toutes nos observations, pour les vins n'ayant pas reçu d'acide sulfureux, ou ayant reçu des doses égales ou inférieures à 100 mg/l avant la fermentation alcoolique, la désacidification biologique a eu lieu dès la fin de la fermentation alcoolique et au plus tard dans le mois qui a suivi la fermentation (résultats du tableau XXV par exemple). Ce n'est que dans

les cas où l'addition d'acide sulfureux avant fermentation dépassait 120 mg que l'on observait la fermentation malolactique qu'au printemps.

Toutes ces observatoins ont été faites dans les conditions normales de la pratique. Elles apportent la preuve que l'on peut dans de tels cas obtenir la fermentation malolactique très tôt et sans accident. Ce doit être l'un des buts essentiels des techniques de vinification.

La durée de cuvaison peut avoir une influence sur la durée de la fermentation malolactique. Dans une expérience dont le but était l'étude de la vinification d'un vin rouge de Bordeaux, type Clairet, une grande cuve en cours de fermentation a été écoulée par fraction après 3 jours, 5 jours, 7 jours et 14 jours. Les analyses effectuées sur les vins ainsi produits donnent les résultats rassemblés dans le tableau XXVI montre que l'écoulage précoce a retardé à la fois la fermentation alcoolique et la fermentation malolactique.

TABLEAU XXVI

Influence de la durée de cuvaison sur les fermentations alcoolique et malolactique

	Écoulé			
	après 3 j.	après 5 j.	après 7 j.	après 14 j.
Analyse aussitôt après l'écoulage (2 novembre 1949) :				
Sucre ..... g	11,5	5,0	3,6	1,8
pH	3,49	3,56	3,58	3,62
Acidité totale ..... méq	75	69	62	62
— volatile ..... —	5	5,3	5,9	7,5
Acide malique ..... —	14,8	6	3	0
— lactique ..... —	7	14,2	14,2	17,0
— tartrique ..... —	25,5	25,3	25,0	25,0
Indice de permanganate total	44	56	62,5	71
Indice de permanganate colorant	33	43,5	48,5	62
Indice de permanganate tanin	12	14,5	15,5	
Intensités colorantes relatives	37,5	50	75	100
Analyse des mêmes vins en mars 1950 :				
Sucre ..... g	3,6	1,8	1,8	1,8
pH	3,5	3,55	3,54	3,51
Acidité totale ..... méq	65	54	67	65
— volatile ..... —	5,3	5,6	7,2	8,1
Acide malique ..... —	0	0	3	0
— citrique ..... —	3,6	3,5	3,6	3,8
— tartrique ..... —	18,4	20,7	21,4	22
— lactique ..... —	13,7	15	15	15,5
Indice de permanganate total	50	60	70,5	80
Indice de permanganate colorant	33	39	56	60
Indice de permanganate tanin	16	15	16	22

GARINO-CANINA avait signalé l'influence défavorable sur la fermentation malolactique de la suppression du contact du jus de raisin avec des particules solides ; sans doute l'abaissement de température intervient également.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Le chapitre I est consacré aux méthodes analytiques utilisées dans ce travail et auxquelles nous avons apporté une contribution personnelle: acide lactique, glycérol, acide gluconique.

***

Dans le chapitre II nous étudions d'abord les conditions de l'invasion des vignobles par le *Botrytis cinerea*, qui conduit, suivant les circonstances atmosphériques, à la pourriture grise, très préjudiciable à la qualité du vin, ou à la pourriture noble, qui permet au contraire l'obtention de vins de grande qualité.

Après un relevé de nos connaissances sur la pourriture noble, nous relatons nos essais de cultures pures de *Botrytis* au laboratoire à la surface du moût de raisin. Cette technique permet de faire varier les conditions de culture et de comparer l'action des diverses souches de *Botrytis*. La combustion des sucres a été ainsi chiffrée, de même que celle des acides. Les acides tartrique et malique sont identiquement attaqués, tandis qu'apparaissent dans les milieux de culture d'autres acides, en particulier l'acide citrique. Cette formation est soumise aux conditions d'acidité du milieu. Aux pH bas, on constate toujours une désacidification par combustion des acides ; au contraire aux pH élevés, il y a généralement acidification, par production d'acide citrique. Cette fermentation citrique, qu'on retrouve pour un grand nombre de moisissures, a été rattachée au phénomène respiratoire et au cycle tricarboxylique de Krebs.

Nous avons démontré la présence d'acide gluconique dans les moûts attaqués. Cet acide provient d'une oxydation directe du glucose par l'intermédiaire de la glucose-oxydase. Cette formation, connue comme une propriété d'un grand nombre de champignons, n'avait jamais été indiquée chez le *Botrytis cinerea*. Enfin, les bilans acidimétriques montrent qu'il se forme encore d'autres acides, que nous n'avons pu identifier.

La production de glycérol, découverte par Laborde, a été confirmée. On peut la considérer comme liée à une transformation glycéropyruvique aérobie du sucre. Des essais à différentes acidités ont montré qu'aux pH élevés la formation est plus faible, ou plus exactement que la combustion du glycérol formé est plus forte.

Nous avons suivi l'action du *Botrytis* au vignoble même, par des analyses comparatives détaillées de raisins sains et de raisins pourris. Les résultats de chaque analyse sont exprimés sous deux formes différentes : par rapport à un certain nombre de grains de raisin, ce qui permet de saisir le phénomène physiologique indépendamment de la concentration par évaporation d'eau, et la valeur rapportée au litre de moût qui donne la somme des deux actions.

Nous retrouvons dans l'action physiologique du *Botrytis*, avec quelques variantes, ce qui a été observé en cultures pures. La proportion de sucre brûlé dans le raisin peut atteindre 35 à 44 p. 100. La qualité exceptionnelle des vins de pourriture noble ne peut s'obtenir que par une perte considérable de quantité. L'action sur l'acidité s'est montrée un peu différente in vivo et in vitro, et l'acide malique a été beaucoup moins attaqué dans le raisin qu'il ne l'est en culture liquide. Nous avons cherché une explication à cette différence. De même sur raisin, nous n'avons jamais observé la formation d'acide citrique. Par contre, l'acide gluconique et le glycérol ont toujours été retrouvés dans les raisins botrytisés.

Le phénomène physique de concentration a été étudié. Ces transformation profondes du raisin expliquent la composition particulière de ces vins. Ils présentent les caractères analytiques de vins concentrés, sans que tous les éléments cependant soient concentrés de la même façon. En particulier l'acide tartrique de ces vins est toujours relativement faible. Au point de vue acidimétrique, ils se différencient par la plus grande richesse en acides faibles et par un taux de salification des acides plus élevé.

Finalement la vinification des vins liquoreux à l'aide de la pourriture noble peut être représentée comme un moyen pour le viticulteur d'obtenir des vins plus riches, sans multiplier cependant par le même facteur le sucre et l'acidité. L'utilisation du *Botrytis* se présente, en somme, comme une véri table technique de désacidification biologique des vins. Cette désacidification, qui s'attaque surtout à l'acide tartrique, joue pour ces vins, le même rôle que la fermentation malolactique, à l'étude de laquelle est consacré le chapitre III, joue pour les autres vins, en faisant disparaître l'acide malique.

***

Dans le chapitre III, avant d'étudier les facteurs qui agissent sur la fermentation malolactique ou fermentation de l'acide malique par certaines bactéries du vin avec formationd'aci de lactique et de CO_2, nous avons cherché à élucider son mécanisme chimique qui n'avait jamais été envisagé par les œnologues. Nous avons d'abordé tudié le mécanisme de la fermentation de l'acide citrique ; nos déterminations quantitatives rendent très probable l'hypothèse selon laquelle l'acide oxalacétique et l'acide pyruvique sont des termes intermédiaires de la dégradation de l'acide citrique et il est très probable qu'ils sont aussi des intermédiaires de la fermentation malolactique.

L'acide pyruvique, lorsqu'il provient de l'acide citrique donne naissance à de l'acide acétique, du 2,3 butanediol, de l'acétylméthylcarbinol ou acétoïne. Par contre lorsqu'il provient de l'acide malique, l'acide pyruvique trouve en face de lui, provenant de la déshydrogénation de l'acide malique, une quantité d'hydrogène équivalent qui le réduit entièrement en acide lactique. Il y a réduction et oxydation couplées.

Nous montrons que le 2,3 butanediol d'un vin ne provient pas unique-

ment de la fermentation alcoolique, mais pour une fraction, de l'ordre de 5 à 10 p. 100, de l'acide citrique.

Les circonstances et le conséquences de la fermentation malolactique ont été étudiées depuis longtemps dans le cas des vins rouges ou des vins blancs secs, mais très peu dans celui des vins blancs issus de vendanges plus ou moins botrytisées et pour cette raison assez fortement sulfitées. Deux questions d'ordre technique se posaient : dans ces types de vin, subissant les traitements qui leur sont habituels, la fermentation malolactique est-elle un phénomène normal, habituel ? La forte diminution d'acidité qu'elle engendre conduit-elle à une amélioration de la qualité comme dans le cas des grands vins rouges ?

En dehors de l'influence du pH qui est bien connue et qui explique que les vins de certains cépages subissent cette transformation plus facilement que d'autres, nous avons étudié plus spécialement l'influence de l'oxygène qui n'est pas celle que l'on croit généralement : la présence ou l'absence d'oxygène dissous dans un vin ne modifie pas sensiblement le développement des bactéries et la vitesse de la fermentation ; bien plus l'anaérobiose absolue, réalisée dès l'ensemencement, la rend beaucoup plus difficile, contrairement aux idées anciennes.

La fermentation malolactique peut se produire bien avant le terme de la fermentation alcoolique du sucre, sans que ce sucre soit nécessairement attaqué par les bactéries.

Une addition notable d'acide sulfureux empêche la fermentation malolactique qui est un phénomène général et normal dans le cas des vins issus de vendanges non botrytisées ou faiblement botrytisées. Nous donnons à ce sujet un certain nombre d'observations effectuées dans les conditions du laboratoire ou dans celles de la pratique courante. Dans de tels vins, comme dans les vins rouges, cette transformation est, par l'assouplissement qu'elle engendre, un facteur de qualité : elle donne au vin du mœlleux, de la souplesse, l'apparence d'être légèrement sucré, même s'il ne renferme plus de sucre, avec ce grands avantage que le vin n'exige pas de doses notables d'acide sulfureux pour sa conservation.

Par contre, dans le cas des vins blancs issus de vendanges fortement botrytisées, il n'est généralement pas possible, même sans addition notable d'acide sulfureux, d'obtenir une diminution d'acidité par fermentation malolactique ; et d'ailleurs celle-ci ne serait généralement pas un élément de qualité. Ici un facteur essentiel de la qualité, l'obtention d'une acidité suffisamment faible, est lié à l'activité du *Botrytis*, c'est-à-dire aux phénomènes que nous avons étudiés dans le chapitre précédent.

Bien entendu il existe tous les types intermédiaires pour lesquels la fermentation malolactique peut être plus ou moins utile ou nuisible, plus ou moins facile ou difficile, et qu'il appartient à l'œnologue de juger dans chaque cas particulier.

BIBLIOGRAPHIE

Chapitre premier

(1) Peynaud (E.). — *Contribution à l'étude biochimique de la maturation du raisin et de la composition des vins.* Thèse Ing. Docteur, Bordeaux, 1946.
(2) Girard (A.) et Lindet (L.). — *Revue de Vitic.*, 1895, **4**, 317 ; 1896, **6**, 173 ; 1898, **9**, 736.
(3) Genevois (L.). — *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1936, **18**, 295.
(4) Genevois (L.), Peynaud (E.), et Ribéreau-Gayon (J.). — *C. R. Acad. Sci.* 1946, **223**, 693 ; 1947, **224**, 762 ; 1948, **226**, 439 ; 1949, **229**, 479 ; 1948, **227**, 227 ; 1949, **229**, 777.
(5) Ferré (L.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1928, **21**, 75.
(6) Ribéreau-Gayon (J.). — *Bull. Ass. Chim.* 1938, **55**, 601. *Ann. Ferment.* 1941, **6**, 228 ; 1942, **7**, 21
(7) Ribéreau-Gayon (J.) et Peynaud (E.). — *Analyse et contrôle des vins*, Béranger, éd., Paris, 1948.
(8) Genevois (L.) et Ribéreau-Gayon (J.). — *Le vin*, Hermann et Cie, éd., Paris, 1947.
(9) Gille (R.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1932, **25**, 146.
(10) Jaulmes (P.). — *Analyse des vins*, Poulain, éd., Montpellier, 1951.
(11) Peynaud (E.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1939, **32**, 228.
(12) Denigès (G.), Chelle (L.) et Labat (A.). —*Précis de Chimie analytique*, Maloine, éd., Paris, 1930.
(13) Peynaud (E.). — *Ann. Falsif.* 1936, **29**, 260.
(14) Peynaud (E.). — *Bull. Inter. Vin.*, 1938, **118**, 33.
(15) Peynaud (E.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1938, **31**, 332.
(16) Peynaud (E.) et Charpentié (Y.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1950, **43**, 246.
(17) Peynaud (E.) et Charpentié (Y.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1954, 47.
(18) Ournac (A.). — *Ann. Techn. Agric.* 1953, **2**, 137.
(19) Peynaud (E.) et Charpentié (Y.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1953, **46**, 14.
(20) Fleury (P.) et Lange (J.). — *C. R. Acad. Sci.*, 1932, **191**, 1395.

Chapitre II

(1) Ribéreau-Gayon (J.) et Peynaud (E.). — *C. R. Académie Agriculture*, 1938, **24**, 535. — Michel (A.), *Vignes et Vins*, 1949, **6**, 23.
(2) Laborde (J.). — *Cours d'œnologie*, Féret édit., Bordeaux, 1907.
(4) Von Der Heide (C.) et Schmitthenner (F.). — *Der Wein*, Vieweg éd., Brunswich, 1922, p. 39.
(4) Guillon (J. M.). — *Revue Viticulture*, 1906, **26**, 117. — Lafon (R.) et Lafon (J.). — La pourriture des raisins en Charente.
(5) Ravaz (L.) et Gouirand (G.). — *Revue Viticulture*, 1896, **6**, 101. — Guillon (J. N.) et Gouirand (G.). — *Revue Viticulture*, 1899, 12. — Peynaud (E.) et Lafon (J.). — *Vignes et Vins*, 1953, **24**, 12.
(6) Neubaüer (C.). — *Landwirt. Versuchstationen*, 1869, **11**, 416.
(7) Müller-Thurgaü (H.). — Die Edelfaüle der Trauben, *Landwirt. Jahrbücher*, 1888, **17**, 83.
(8) Marchal (E.), Manil (P.) et Vanderwalle (R.). — *Eléments de pathologie végétale.* Duculot éd., Genève, 1937, p. 159.
(9) Hansen (H. N.) et Smith (R. E.). — *Phytopathology*, 1932, **22**, 953.
(10) Barnes. — *Ann. Botanique*, 1930, **44**, 825.

(11) Pesante (A.). — *Ann. Accad. Agric. Torino*, 1947 (*In Ann. Staz. enologia sperim. Asti.*, 1937, **19**, 52, p. 23).
(12) Foster (J. W.). — *Chemical activities of fungi*, Academic Press éd., New-York, 1949.
(13) Rippel (A.) et Heilmann (I.). — *Arch. Mikrobiol.*, 1930, **1**, 119.
(14) Chrzaszcz (T.) et Léonard (K.). — *Biochem. Journ.* 1936, **30**, 1233. — Chrzaszcz (T.) et Tiukow (D.). — *Biochem. Zeits*, 1930, **229**, 343. — Chrzaszcz (T.) et Zakomorny (M.), *Ibid.*, 1936, **285**, 340 ; 1936, **285**, 348.
(15) Tombesi (L.) et Fortini (S.). — *Stazione chimico-agraria sperim.* Rome, 1950.
(16) Peynaud (E.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1952, **45**, 11.
(16 *bis*) Colin (H.). — *Hydrolyse de quelques polysaccharides par le* Botrytis cinerea. Thèse de Doctorat de Sciences naturelles, Paris, 1911.
(17) Behrens (J.). — *Centralblatt. für Bakt.*, 1898, **4**, 514.
(18) Windisch (K.). — *Berichte Geisenheim*, 1903, p. 142.
(19) Garino-Canina (E.), Capris (N.) et Passera (U.). — *Ann. Sperim. Agraria*, 1951, **5**.
(20) Laborde (J.). — *Rev. de Vitic.* 1897, **7**, 524 ; 1897, **8**, 301. *Etude de quelques points de vinification.* Imp. Lahure, Paris, 1903.
(21) Schoen et Ekrem Eras. — *Enzymologia*, 1937, **4**, 198.
(22) Ribéreau-Gayon (J.), Peynaud (E.) et Lafourcade (S.). — *C. R. Académie Sciences*, 1952, **234**, 478.
(23) Behrens (J.). — *Arb. Gesundheitsamte*, 1905, **23**, 134.
(24) Ventre (J.). — *Traité de vinification pratique et rationnelle.* Coulet éd., Montpellier, 1929, **1**, p. 44.
(25) Blarez (Ch.), Denigès (G.). et Gayon (U.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1914, **7**, 9.
(26) Molliard (M.). — *C. R. Acad. Sciences*, 1922, **174**, 881 ; 1924, **178**, 41 ; 1924, **178**, 161.
(27) Müller (D.). — *Chem. Zeit.* 1926, **50**, 101.
(28) Birkenshaw (J. H.) et Raistick (H.). — *Ibid.* 1931, **220**, 331. — Birkenschaw (J. H.), Charles (J. H. V.), Heterington (A. C.) et Raistick (H.). — *Trans. Royal Soc. London* 1931, **220**, 355.
(29) Takahashi (T.) et Asaï (T.). — *Zentr. Bakt. Para. Abt.*, 1933, **88**, 276.
(30) Takahashi (T.) et Asaï (T.). — *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 1933, **9**, 443.
(31) Peynaud (E.) et Charpentié (Y.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1953, **46**, 14.

Chapitre III

(1) Seifert (W.). — *Die Chemie des Mostes und Weines.* Diemer éd., Mainz, 1938, p. 210.
(2) Müller-Thurgau (H.) et Osterwalder. — *Die Bakterien im Wein und Obstwein.* G. Fischer éd., Iéna, 1913.
(3) Lüthi (H.) et Rentschler (H.). — *Jahresbericht 1949-51 Versuchsanstalt Wädenswill*, p. 631.
(4) Rippel (K.). — *Bull. Inter. Vin*, 1943, **155**, 89 ; 1943, **159**, 87.
(5) Schanderl (H.). — *Deutsche Wein Zeit.*, 1943, n° 43-46.
(6) Garino-Canina (E.). — *Bull. Inter. Vin*, 1943 **159**, 63. *Acc. italiana Vite Vino*, 1952, **4**.
(7) Moreau (L.) et Vinet (E.). — *Guide de vinification rationnelle des raisins blancs.* Imp. Sciences agricoles, Paris, 1928, p. 171.
(8) Ferré (L.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1928, **21**, 67.
(9) Ribéreau-Gayon (J.). — *C. R. Acad. Agric.*, 1938, **24**, 600. *Bull. Ass. Chim.*, 1938, **55**, 601 ; *Ann. Ferm.*, 1942, **7**, 21.
(10) Ribéreau-Gayon (J.) et Peynaud (E.). — *Ann. Ferm.*, 1938, **4**, 559.
(11) Peynaud (E.). — *Contribution à l'étude biochimique de la maturation des raisins et de la composition des vins.* Thèse Ing. Docteur, Bordeaux, 1946.

(12) Pien (J.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1937, **30**, 473.
(13) Deffner (M.). — *Ann. Chemie*, 1938, **535**, 44. — Deffner (M.) et Franke (W.). — *Ann. Chemie*, 1939, **541**, 85.
(14) Hooreman (M.). — *Contribution à l'étude de la fermentation butanediolique*. Thèse Sciences, Paris, 1948.
(15) Peynaud (E.) et Lafon (M.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1951, **44**, 264.
(16) Peynaud (E.). — *Rev. Ferm. Ind. alim.*, 1947, **2**, 150.
(17) Hirsch (J.). — *Biochem. Zeit.*, 1922, **131**, 178.
(18) Neuberg (C.) et Gorr (G.). — *Biochem. Zeit.*, 1924, **154**, 495.
(19) Krampitz (L. O.) et Werkmann (C. H.). — *Biochem. Journ.*, 1941, **35**, 595.
(20) Wieland (H.), Probst (O.), Walch (H.), Schwarze (W.) et Rauch (K.). — *Ann. chem.*, 1939, **542**, 145.
(21) Charpentié (Y.), Ribéreau-Gayon (J.) et Peynaud (E.). — *Bull. Soc. chim. biol.*, 1951, **33**, 1369.
(22) Peynaud (E.). — *Ann. Falsif. Fraudes*, 1938, **31**, 332.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION

CHAPITRE PREMIER

MÉTHODES ANALYTIQUES UTILISÉES

CHAPITRE II

ÉTUDE DE LA SURMATURATION DU RAISIN PAR BOTRYTIS CINEREA

I. — **Historique des connaissances sur la pourriture noble**..... 28

II. — **Transformations produites par Botrytis cinerea cultivé sur moût de raisin** 32

III. — **Etude de la surmaturation du raisin par la pourriture noble.** 47

IV. — **Composition des grands vins liquoreux**..... 60

CHAPITRE III

ÉTUDE DES FERMENTATIONS DES ACIDES MALIQUE ET CITRIQUE PAR LES BACTÉRIES LACTIQUES

I. — **Étude théorique**..... 67

II. — **Étude des conditions techniques de la fermentation malo-lactique**..... 73

Résumé et Conclusion..... 86

Bibliographie 89

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 3-6-1954.
Dépôt légal: 2e trimestre 1954 *N° d'impression: 364*

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté :

LES IDÉES ACTUELLES SUR L'ACIDITÉ

VU ET APPROUVÉ :

Bordeaux, le 9 Mars 1954.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

G. BRUS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Bordeaux le 11 Avril 1954.

Le Recteur de l'Académie,

Le Vice-Président du Conseil de l'Université,

A. GARRIGOU-LAGRANGE.